

UNIVERSITÉ DE PARIS

ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE

Année 1913-1914.

N° 3.

RECHERCHES SUR LA SYNTHÈSE BIOCHIMIQUE

DE

L'ÉTHYLGLUCOSIDE B par l'ÉMULSINE

THÈSE

Pour l'obtention du diplôme de Docteur de l'Université de Paris

(PHARMACIE)

Présentée et soutenue le 13 Décembre 1913.

PAR

Jean COIRRE

PHARMACIEN DE PREMIÈRE CLASSE

JURY { MM. BOURQUELOT, Président.
BERTHELOT, Professeur.
HÉRISSEY, Agrégé.

LONS-LE-SAUNIER

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE LUCIEN DECLUME

1913

UNIVERSITÉ DE PARIS
ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE

Année 1913-1914.

N° 3.

RECHERCHES SUR LA SYNTHÈSE BIOCHIMIQUE
DE
L'ÉTHYLGLUCOSIDE B par l'ÉMULSINE

THÈSE

Pour l'obtention du diplôme de Docteur de l'Université de Paris

(PHARMACIE)

Présentée et soutenue le 13 Décembre 1913.

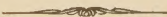
PAR

JEAN COIRRE

PHARMACIEN DE PREMIÈRE CLASSE



JURY { MM. BOURQUELOT, Président.
BERTHELOT, Professeur.
HÉRISSEY, Agrégé.


LONS-LE-SAUNIER

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE LUCIEN DECLUME

—
1913

PERSONNEL DE L'ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. GAUTIER, Directeur, *,  I.
 BOURQUELOT, Assesseur, *,  I.
 E. MUSSON, Secrétaire, *,  I.

PROFESSEURS

MM. GUIGNARD, Membre de l'Institut, O. *,  I.....	Botanique générale.
VILLIERS, *,  I.....	Chimie analytique.
BOURQUELOT, *,  I.....	Pharmacie galénique.
GAUTIER, *,  I.....	Chimie minérale.
RADAIS, *,  I.....	Cryptogamie.
BÉHAL, O. *,  I.....	Chimie organique.
PERROT, *,  I.....	Matière médicale.
COUTIÈRE, *,  I.....	Zoologie.
BERTHELOT,  I.....	Physique.
GRIMBERT, *,  I.....	Chimie biologique.
MOUREU, Membre de l'Institut, *,  I.....	Pharmacie chimique.
LEBEAU,  I.....	Toxicologie.
DELÉPINE,  I.....	Hydrologie et Hygiène.

Directeur honoraire : M. GUIGNARD, O. *,  I.
Professeurs honoraires : MM. JUNGFLEISCH, O. *,  I.
 et BOUCHARDAT, O. *,  I.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. GUERBET,  I.	MM. GUÉRIN,  I.
VALEUR,  A.	GUÉGUEN,  I.
BOUGAULT,  A.	LUTZ,  I.
TASSILLY,  I.	HÉRISSEY,  I.

CHARGÉS DE COURS

MM. GUERBET,  I.....	Minéralogie.
HONNORAT,  I.....	Législation et déontologie pharmaceutiques

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. DEFACQZ,  I.....	Chimie générale.
COUSIN,  I.....	Chimie analytique.
SOUÈGES,  A.....	Micrographie.
MOURLOT,  I.....	Physique.
BARTHELAT,  I.....	Microbiologie.

Chef du Laboratoire des examens pratiques : M. JAVILLIER,  I.
Bibliothécaire en Chef : M. DORVEAUX,  I.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR BOURQUELOT,

PHARMACIEN EN CHEF DE L'HOPITAL LAENNEC
MEMBRE DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE.

Hommage de respect et de reconnaissance.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ HERISSEY,
PHARMACIEN EN CHEF DE L'HOPITAL BROUSSAIS.

*En témoignage de reconnaissance
et de sincère affection.*

A LA MÉMOIRE DE MON GRAND-PÈRE

P. COIRRE,

PHARMACIEN DE 1^{re} CLASSE.

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

G. COIRRE,

PHARMACIEN DE 1^{re} CLASSE.

A LA MÉMOIRE DE MA MÈRE.

MEIS ET AMICIS.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INTRODUCTION.

La possibilité de réaliser par voie biochimique à l'aide de l'émulsine ou d'autres ferments, la synthèse de nombreux dérivés de sucres et d'alcools variés, est un fait que BOURQUELOT et ses élèves ont mis pleinement en lumière dans des travaux publiés au cours de ces deux dernières années (1).

De nombreux glucosides β et α , dérivés du glucose d. et plusieurs galactosides β ont été ainsi obtenus synthétiquement par l'action de l'émulsine des amandes ou de la glucosidase α et préparés à l'état pur et cristallisé. La synthèse de chacun de ces glucosides nécessite la réalisation de certaines conditions expérimentales qui, jusqu'à présent, n'ont pas été étudiées dans le détail, et qui cependant méritent d'être fixées avec le plus grand soin ; elles sont, en effet, susceptibles de varier largement d'un glucoside à un autre.

La formation du méthylglucoside β par l'action synthétisante de l'émulsine des amandes a fait l'objet d'un travail de VERDON (2), qui a fixé d'une façon qui semble défini-

(1) Le lecteur désireux d'avoir un aperçu complet de cette question, pourra se reporter à deux conférences faites par M. BOURQUELOT, l'une devant la Société chimique de France, le 9 mai 1913 : *La synthèse des glucosides à l'aide des ferments.*— *Réversibilité des actions fermentaires*; l'autre, devant le XI^e Congrès international de Pharmacie de La Haye : *La synthèse des glucosides par les ferments : glucosides α* (*Journ. de Pharm. et de chim.*, (7), 337-359, 1913).

(2) Contribution à l'étude de l'action synthétisante de l'émulsine. Action de l'émulsine sur le glucose en solution dans l'alcool méthylique : *Thèse doct. Univ. (Pharm.)*, Paris, 1913.

tive les conditions pratiques les mieux appropriées à l'obtention de ce glucoside sous un fort rendement.

Dans le présent travail, dont je dois le sujet à M. BOURQUELOT, je me suis proposé d'étudier les conditions d'action de l'émulsine sur le glucose d. en présence de l'alcool éthylique, action qui conduit à la formation de l'éthylglucoside β , deuxième terme d'une série dont le méthylglucoside constitue le premier.

La question du dédoublement d'un glucoside dans un dissolvant déterminé est absolument corrélatrice de celle de sa synthèse biochimique dans le même milieu, comme nous l'enseigne la doctrine de la réversibilité mise hors de conteste par BOURQUELOT ; il s'ensuit que l'état de l'hydrolyse d'un glucoside dans un alcool peut nous fournir des renseignements précis sur la façon de se comporter du même alcool au cours d'essais de synthèse biochimique. C'est ainsi que BOURQUELOT et BRIDEL ont pu mettre à profit les faits observés au cours du dédoublement de la salicine par l'émulsine dans l'alcool éthylique. J'ai pensé qu'il serait peut-être profitable d'étudier au même point de vue un glucoside autre que la salicine, et j'ai choisi la syringine, dont le dédoublement paraissait devoir présenter quelques particularités.

L'étude du dédoublement de la syringine avec l'alcool éthylique fera précisément l'objet du chapitre premier.

Comme l'action hydrolysante de l'émulsine est influencée par le degré alcoolique du milieu, il va de soi qu'il doit en être de même pour son action synthétisante. J'ai exposé dans le chapitre II le résultat de mes recherches sur ce point.

J'ai étudié dans le Chapitre III l'influence que peut avoir la quantité de ferment employé sur la marche de la synthèse et sur la limite atteinte, et dans le Chapitre IV l'influence que peut avoir la température aux mêmes points de vue.

Dans le Chapitre V j'ai étudié les variations de l'action synthétisante suivant la proportion de glucose employé dans la réaction.

J'ai relaté dans les Chapitres VI et VII les résultats d'essais effectués dans des milieux renfermant du phénol ou de l'acétone.

Pensant que l'on pourrait avantageusement remplacer l'émulsine en poudre par une macération d'amandes, plus facile et plus rapide à préparer, j'ai institué quelques expériences qui ont abouti à des résultats positifs ; j'expose ces expériences dans le Chapitre VIII.

Enfin, dans le Chapitre IX, j'ai indiqué l'ensemble des conditions les mieux appropriées à la préparation de l'éthylglucoside β ; l'obtention de ce produit est à l'heure actuelle d'une telle facilité que le mode opératoire que j'indique doit conduire à des résultats sûrs, même entre les mains les moins expérimentées.

Pour préparer l'éthylglucoside β par synthèse biochimique, trois corps doivent être mis en présence : d'une part le *glucose* d. et l'*alcool éthylique*, d'autre part le *ferment*.

Dans le cas présent ce ferment est l'émulsine, j'ai donc au début de ce travail, préparé une assez grande quantité d'*émulsine*, 150 grammes environ, en utilisant un même lot d'amandes.

Le ferment a été préparé suivant le procédé indiqué par HÉRISSEY (1) ; il nous a donné en moyenne un rendement de 15 grammes de produit sec par kilogramme d'amandes.

Possédant ainsi une quantité de ferment suffisante pour réaliser toutes les expériences qui devaient suivre, je pouvais de cette manière compter sur des résultats logiquement comparables entre eux. On sait, en effet, que l'émulsine est en réalité un mélange de plusieurs ferments, et

(1) Recherches sur l'émulsine, *Thèse doct. Univ. (Pharm.)*, Paris, 1899.

que sa composition, par suite, peut être soumise à certaines variations ; l'on conçoit donc qu'il soit indispensable d'opérer toujours sur le même produit, lorsqu'on veut étudier l'influence de facteurs divers sur les conditions d'action du ferment.

Le *glucose* d. qui m'a servi est du « glucose purifié du commerce », que j'ai fait recristalliser. A cet effet, 200 grammes de « glucose purifié du commerce » étaient traités pendant une heure, en agitant souvent, dans un ballon avec réfrigérant à reflux par deux litres d'alcool à 95°, à l'ébullition ; puis on laissait reposer et on décantait dans un flacon. On amorçait avec du glucose d., et quelques jours après, lorsque la cristallisation était terminée, on recueillait les cristaux sur un entonnoir, et après les avoir lavés avec un peu d'alcool à 95°, on les essorait et on les séchait d'abord à l'air, puis dans le vide sulfurique.

Un kilogramme de glucose pur traité de la sorte, par portions de 200 grammes, a fourni environ 800 grammes d'un produit très blanc dont le pouvoir rotatoire dans l'eau a été trouvé :

$$\alpha_D = + 52^{\circ},2$$

$$(p = 0 \text{ gr. } 226 ; v = 15 ; l = 2 ; \alpha = + 1^{\circ}38' = 1^{\circ},663.)$$

J'ai déterminé le pouvoir rotatoire de ce glucose dans les alcools éthyliques de différents titres.

Voici les résultats obtenus :

- 1° Alcool éthylique à 30° : $\alpha_D = + 52^{\circ},8$
($p = 1 \text{ gr. } 3265 ; v = 25 ; l = 2 ; \alpha = + 5^{\circ}34' = 5^{\circ},566$).
- 2° Alcool éthylique à 60° : $\alpha_D = 54^{\circ},2$
($p = 1 \text{ gr. } 2055 ; v = 25 ; l = 2 ; \alpha = + 5^{\circ}14' = 5^{\circ},233$).
- 3° Alcool éthylique à 96° : $\alpha_D = + 56^{\circ},9$
($p = 1 \text{ gr. } 2295 ; v = 100 ; l = 2 ; \alpha = + 1^{\circ}24' = 1^{\circ},40$).

Ils montrent que le pouvoir rotatoire du glucose en solution dans des alcools éthyliques de différents titres aug-

mente avec le degré alcoolique. Le lecteur devra donc ne pas oublier cette particularité lorsqu'il constatera des rotations initiales différentes pour des liquides alcooliques de titres divers, contenant tous la même quantité de glucose.

Dans la plus grande partie des essais, les *alcools éthyliques* de différents titres ont été préparés en volume. On est parti de l'alcool à 95° et on a ajouté de l'eau en proportion convenable, de façon à obtenir les titres voulus. Certains essais ont été effectués avec des alcools préparés en poids. Nous l'indiquons alors expressément.

Les nombreux dosages de sucre réducteur que j'ai eu à opérer, ont été effectués par le procédé de G. BERTRAND (1), procédé dont le principe a été indiqué autrefois par MOHR (2). Cette méthode donne des résultats excellents. L'alcool présent dans les mélanges a été chassé par évaporation et le dosage du sucre effectué sur la solution aqueuse de l'extrait obtenu.

Avant d'aborder l'étude des différents chapitres de ce travail, il me reste un devoir de reconnaissance à remplir envers les deux maîtres qui m'ont guidé dans mes recherches, et m'ont permis de mener à bien les études que j'avais entreprises.

Monsieur le Professeur BOURQUELOT, depuis longtemps déjà, a bien voulu s'intéresser à moi. En me choisissant ce sujet de recherches, il m'a permis de collaborer pour une modeste part au nouveau chapitre qu'il vient de créer dans l'étude des ferments. Je souhaite qu'en lisant ce travail il ne regrette pas la confiance dont il avait bien voulu m'honorer. C'est à lui aussi que je dois de connaître Monsieur HÉRISSEY, en qui j'ai trouvé en même temps qu'un maître distingué, le meilleur des amis. Je lui en suis pro-

(1) Le dosage des sucres réducteurs ; *Bull. Soc. Chim.*, (3), XXXV, 1285-1299, 1906.

(2) *Zeitschr.-f. anal. Chim.*, XII, 296, 1873.

fondément reconnaissant. Monsieur le Professeur agrégé HÉRISSEY a su éveiller en moi le goût des recherches scientifiques. Il m'a fait profiter de la grande expérience qu'il a acquise au cours de ses travaux. Je lui renouvelle ici l'expression de ma respectueuse affection.

Ma gratitude est également acquise à Monsieur BRIDEL, préparateur du cours de Pharmacie Galénique, dont les conseils m'ont été d'un grand secours dans la suite des essais que j'avais entrepris.

CHAPITRE PREMIER.

Action de l'émulsine sur la syringine en solution dans les alcools éthyliques de différents titres.

Avant d'entreprendre l'étude de la synthèse biochimique de l'éthylglucoside β , il était intéressant d'examiner la façon dont pouvait se comporter l'émulsine au point de vue de son action hydrolytique dans des alcools éthyliques de différents titres.

Cette action a été étudiée déjà par BOURQUELOT et BRIDEL qui ont opéré sur la salicine et la gentiopicroine (1).

Comme le dédoublement des glucosides par l'émulsine en milieu alcoolique peut présenter quelques particularités au point de vue de la réaction, suivant le corps mis à dédoubler, il y a un certain intérêt à envisager d'autres glucosides que ceux déjà étudiés à ce point de vue. C'est ce que j'ai fait avec la syringine ($C^{17}H^{24}O^9 + H^2O$). J'avais à ma disposition un certain nombre d'échantillons de ce produit, préparé au laboratoire de Pharmacie Galénique et provenant de recherches qui y ont été effectuées par J. VINTILESCO (2).

Ces échantillons ont été pulvérisés puis mélangés intimement au mortier et j'en ai pris le pouvoir rotatoire dans l'eau.

(1) Em. BOURQUELOT et BRIDEL. — De l'action synthétisante et de l'action hydrolysante de l'émulsine en milieu alcoolique (*Journ. de Pharm. et Chim.*, (7), VI, 13, 1912).

(2) Recherches sur les glucosides de quelques plantes de la famille de Oléacées ; *Thèse Doct. Univ. (Pharm.)*, Paris, 1906.

J'ai obtenu, pour ce produit qui était cristallisé, c'est-à-dire hydraté :

$$\alpha^D = \frac{0,333 \times 0,25}{2 \times 0,25} = -16^{\circ},65 \text{ (1)}.$$

$$(p = 0 \text{ gr. } 25 ; \nu = 25 ; l = 2, \alpha = -0^{\circ}20' = -0^{\circ},333).$$

J'ai pris ensuite le pouvoir rotatoire de la syringine dans des alcools éthyliques de différents titres :

dans l'alcool éthylique à 10° $\alpha^D = -17^{\circ},19$.

$$(p = 0 \text{ gr. } 1598 ; \nu = 15 ; l = 2 ; \alpha = -0^{\circ}22').$$

dans l'alcool éthylique à 30° $\alpha^D = -19^{\circ},67$.

$$(p = 0 \text{ gr. } 165 ; \nu = 15 ; l = 2 ; \alpha = -0^{\circ}26').$$

dans l'alcool éthylique à 70° $\alpha^D = -22^{\circ},32$.

$$(p = 0 \text{ gr. } 168 ; \nu = 15 ; l = 2 ; \alpha = -0^{\circ}30').$$

Le pouvoir rotatoire de la syringine augmente donc dans de très larges limites avec le degré alcoolique du dissolvant.

J'ai préparé des mélanges contenant sensiblement chacun 0 gr., 50 de syringine dans 50 cm³ d'alcools éthyliques à 10°, 20°, 30°, 50°, 70°, 90° et 95° en volume. J'ai attendu 24 heures avant de prendre la rotation des mélanges, de façon à permettre à la syringine de se dissoudre. La solution ne s'est pas opérée dans l'alcool à 95° ; je n'ai donc pu en prendre la rotation initiale. En même temps que je préparais ces échantillons alcooliques, j'ai dissous 0 gr., 50 de syringine dans 50 cm³ d'eau ; cette dernière solution a été additionnée de 1 cm³ de toluène. La rotation des échantillons étant déterminée, j'ai ajouté à chacun 0 gr., 10 d'émulsine (pour 50 cm³), et j'ai abandonné les mélanges à la température du laboratoire. Je transcris ci-dessous les résultats obtenus.

(1) Pour la syringine du *Lilas*, cristallisée, c'est-à-dire hydraté, VINTILESCO a trouvé $-16^{\circ},64$ pour celle de *Jasminum nudiflorum* $-16^{\circ},67$, pour celle du *Ligustrum lucidum* $-16^{\circ},40$.

TABLEAU I.

Hydrolyse de la syringine dans l'eau et l'alcool éthylique.

COMPOSITION du mélange Syringine 0 gr. 50 pour 50 cm ³	ROTATION initiale (l = 2)	ROTATION ⁽¹⁾ à l'arrêt (l = 2)	DURÉE approximative de la réaction	SUCRE réducteur à l'arrêt pour 100 cm ³
Eau	— 0°20'	+ 0°24'	80 à 90 jours	0 gr., 446
Alcool à 10°	— 0°20'	+ 0° 6'	40 à 45 —	0 gr., 245
Id. 20°	— 0°22'	+ 0° 4'	40 à 45 —	0 gr., 236
Id. 30°	— 0°24'	± 0°	60 à 70 —	0 gr., 213
Id. 50°	— 0°28'	— 0° 6'	60 à 70 —	0 gr., 179
Id. 70°	— 0°28'	— 0°10'	60 à 70 —	0 gr., 129
Id. 90°	— 0°28'	— 0°16'	60 à 70 —	0 gr., 686
Id. 95°	?	— 0° 8'	60 à 70 —	0 gr., 037

Dans le cours de l'expérience on avait ajouté, successivement, deux fois 0 gr., 10 d'émulsine par flacon, la réaction devenant très lente au bout de quelques jours.

L'examen des chiffres obtenus montre que dans l'eau la syringine a été hydrolysée à peu près totalement puisque j'ai obtenu par dédoublement du glucoside, 0 gr., 446 de glucose au lieu du chiffre théorique 0 gr., 461. [C¹⁷H²⁴O⁹ + H²O (= 390) donnent 180 de glucose]. Le retour vers la droite est de plus en plus faible à

(1) Les chiffres indiqués pour les rotations à l'arrêt sont les valeurs calculées après soustraction des rotations propres à l'émulsine dans les divers milieux étudiés.

mesure que croît le degré alcoolique et le dosage du sucre réducteur montre qu'à mesure que l'on s'élève sur l'échelle des degrés alcooliques, on voit diminuer la quantité de glucose restant à l'arrêt de la réaction.

On peut remarquer que, même dans les alcools faibles (à 10°, 20°, 30°), les chiffres obtenus ne correspondent pas à l'hydrolyse totale de la syringine.

D'ailleurs, si même la syringine est totalement hydrolysée, le glucose mis en liberté doit se combiner à l'alcool éthylique pour donner de l'éthylglucoside β ; de telle sorte que l'on ne peut par une simple lecture polarimétrique, se faire une idée sur la limite atteinte par l'hydrolyse. Mais il est possible, en recourant au calcul, comme l'ont fait BOURQUELOT et BRIDEL pour l'hydrolyse de la salicine dans l'alcool éthylique (1), de se rendre compte si l'hydrolyse a été totale ou non. Si on prend comme exemple l'hydrolyse effectuée dans l'alcool éthylique à 70°, on voit qu'il reste à l'arrêt de la réaction 0 gr., 129 de glucose non combiné. Comme un gramme de syringine mis au début donne 0 gr., 4615 de glucose par hydrolyse totale, si celle-ci s'est véritablement produite, il doit s'être combiné 0 gr. 332 de glucose avec l'alcool éthylique pour donner 0 gr., 386 d'éthylglucoside ; à l'aide de ces chiffres on pourra calculer la rotation finale qui devra être (2) :

$$\frac{0,129 \times 2 \times 55,1}{100} - \frac{0,386 \times 2 \times 36,5}{100} = -0^{\circ}.14 = -0^{\circ}8\frac{1}{2}.$$

Or, le chiffre trouvé pour la rotation à l'arrêt de la réaction est -10° ; la légère différence que l'on constate est de l'ordre des erreurs d'expérience ; si elle existe, en réa-

(1) Em. BOURQUELOT et M. BRIDEL. — De l'action synthétisante et de l'action hydrolysante de l'émulsine en milieu alcoolique (*Journ. de Pharm. et de Chim.*, (7), VI, p. 13, 1912).

(2) J'ai pris comme pouvoir rotatoire de l'éthylglucoside β $\alpha_D = 36^{\circ}5$ chiffre que j'ai déterminé comme il sera dit au Chapitre IX.

lité, elle peut provenir de ce fait que la syringine n'a pas été hydrolysée d'une façon absolument complète.

Pour me rendre un compte plus exact de la réaction, j'ai calculé pour chaque mélange l'indice de réduction enzymolytique [poids en milligrammes de sucre réducteur formé pour un changement de rotation de 1° observé au tube de 2 décimètres dans 100 cm^3 de liquide (1)]. J'ai résumé dans le tableau ci-dessous ces calculs. J'ai noté en même temps les indices théoriques (2) que l'on trouverait, s'il ne s'était produit que l'hydrolyse de la syringine sans formation synthétique d'éthylglucoside β ; ces indices varient avec le degré alcoolique par suite de la modification que l'alcool fait subir aux pouvoirs rotatoires de la syringine et du glucose. J'ai rappelé le chiffre obtenu pour la rotation finale, et j'ai calculé le chiffre de la rotation théorique que devaient fournir les mélanges en expérience d'après le calcul indiqué ci-dessus, en admettant que l'hydrolyse soit complète.

(1) Em. BOURQUELOT.— Nouvelle contribution à la méthode biochimique de recherche dans les végétaux de glucosides hydrolysables par l'émulsine; son application à l'étude des plantes employées en médecine populaire (*Journ. de Pharm. et de Chim.*, (7), II. p. 241, 1910).

(2) On a calculé l'indice théorique en prenant comme pouvoir rotatoire de la syringine employée le chiffre de $-16,65$ indiqué précédemment. La faible rotation de ce glucoside expose à des écarts assez sensibles dans les calculs, une différence de $2'$, difficile à apprécier dans une lecture polarimétrique, modifiant d'une façon très appréciable l'indice de réduction. La petite quantité de glucoside que j'avais à ma disposition ne me permettait pas de préparer des quantités suffisantes des diverses solutions pour pouvoir les examiner dans le tube polarimétrique de $0,50\text{ cm}$; d'ailleurs il eût été sans doute impossible de se servir de ce dernier tube à cause de la couleur jaune foncée que donne à la liqueur la syringénine formée par le dédoublement de la syringine.

Le pouvoir rotatoire de la syringine dans les alcools éthyliques de différents titres n'a pas été pris pour chacun d'eux; mais seulement pour trois d'entre eux, comme on l'a vu plus haut. J'ai donc pris pour les solutions alcooliques non examinées les chiffres intermédiaires à ceux qui ont été déterminés.

TABEAU II.

Indice de réduction enzymolytique dans l'hydrolyse de la syringine en milieu aqueux et dans l'alcool éthylique.

COMPOSITION du mélange Syringine 0 gr 50 pour 50 cm ³	ROTATION calculée	ROTATION observée (1 = 2)	INDICE THÉORIQUE calculé sur un rotatoire de 16.65 pour la syringine hydratée	INDICE observé
Eau	+ 0°27'	+ 0°24'	567	608
Alcool à 10° . . .	+ 0° 5'	+ 0° 6'	559	565
Id. 20° . . .	+ 0° 3'	+ 0° 4'	545	546
Id. 30° . . .	± 0	± 0°	524	532
Id. 50° . . .	— 0° 1'	— 0° 6'	504	475
Id. 70° . . .	— 0° 8'	— 0°10'	483	430
Id. 90° . . .	— 0°13'	— 0°16'	462	43
Id. 95° (1).	?	— 0°8'	?	?

Ces chiffres présentent quelques particularités qu'il est intéressant de faire ressortir. La rotation calculée et la rotation observée sont très voisines; toutefois les rotations observées sont, pour les liquides alcooliques, légèrement supérieures aux autres, ce qui montre que vraisemblablement la syringine n'a pas été hydrolysée en totalité. Cette différence est un peu plus grande dans les alcools forts que dans les alcools faibles; dans l'eau, par contre, on voit que la rotation observée est un peu moins forte que la rotation calculée; cette très légère différence est due,

(1) Par suite de l'insolubilité de la syringine dans l'alcool éthylique à 95°, il a été impossible, comme on l'a dit plus haut, de prendre la rotation initiale; pour cette raison aussi on n'a pu prendre le pouvoir rotatoire de la syringine dans cet alcool.

comme le montre d'ailleurs le dosage du sucre réducteur, à ce que toute la syringine n'a pas été hydrolysée.

Les indices de réduction observés se rapprochent beaucoup des indices théoriques dans les alcools faibles. Mais on voit que déjà dans l'alcool à 50° l'indice observé diminue ; dans l'alcool à 90°, il tombe à 43, ce qui montre qu'il s'est formé dans cet alcool beaucoup d'éthylglucoside β . On verra d'ailleurs plus loin que c'est dans l'alcool à 90° que la réaction synthétisante entre le glucose et l'alcool éthylique se poursuit le plus loin.

En résumé, l'émulsine hydrolyse la syringine dans les alcools éthyliques de différents titres ; l'hydrolyse va d'autant plus loin que l'alcool est plus faible. Concurrément avec la réaction hydrolysante il se fait une réaction synthétisante entre le glucose libéré et l'alcool éthylique.

Si on avait affaire à un glucoside possédant un pouvoir rotatoire lévogyre très faible et donnant relativement une assez forte proportion de glucose à l'hydrolyse, on conçoit qu'en effectuant cette dernière dans des alcools éthyliques de titre élevé, on pourrait obtenir, au cours du dédoublement par l'émulsine, par suite de la formation d'éthylglucoside β , des rotations lévogyres plus élevées que la rotation initiale due au glucoside. Ce résultat s'expliquerait très bien par des calculs analogues à ceux qui viennent d'être relatés.

CHAPITRE II.

Action synthétisante de l'émulsine dans des alcools éthyliques de différents titres.

Dans toute la suite de ce travail, je m'occuperai uniquement de l'action synthétisante de l'émulsine sur le glucose d. en solution éthylique.

Je vais d'abord étudier l'influence du titre alcoolique des solutions sur la marche de la synthèse. A cet effet j'ai préparé des solutions contenant 1 gr. de glucose pour 100 cm³, le dissolvant étant constitué par des alcools éthyliques de différents titres, 10°, 20°, 40°, 50°, 60°, 70°, 90° et 95°. Dans ces premiers essais, les titres alcooliques indiqués expriment la composition centésimale en volume du liquide (degrés alcoométriques Gay-Lussac). Dans la suite d'autres essais ont été effectués sur des liqueurs dont la composition est exprimée en centièmes d'alcool en *poids*; on verra qu'il y a dans certains cas avantage à opérer ainsi, au point de vue de la régularité de l'interprétation des résultats obtenus. Les solutions ont été préparées à chaud, les dix flacons contenant donc 1 gr., de glucose pour 100 cm³ de chacun des mélanges, ont été examinés au polarimètre ($l = 2$) au bout de 24 heures seulement, pour permettre à la rotation de se fixer; on a obtenu les déviations indiquées au tableau IV; on remarquera que ces

rotations augmentent avec le degré alcoolique ; l'explication de cette particularité a été fournie précédemment. Les liquides ont été ensuite additionnés de 0 gr., 20 d'émulsine pour 100 cm³ et abandonnés à la température du laboratoire (+ 16° à + 18°). Ils ont été agités deux fois par jour.

La marche de la réaction a été suivie au polarimètre par des lectures faites tous les quatre jours sur des liquides soigneusement filtrés.

Les chiffres des lectures faites après addition de l'émulsine ont dû être corrigés pour la raison suivante : l'émulsine qui est lévogyre entre légèrement en solution dans les liquides alcooliques de titre inférieur ; d'autant plus que l'alcool est plus faible. Une série de témoins contenant des alcools éthyliques de différents titres ont été additionnés de 0 gr., 20 d'émulsine pour 100 cm³. Ils donnaient les rotations suivantes :

TABLEAU III.

Rotation gauche produite par l'émulsine dans des alcools éthyliques de différents titres

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Titre alcoolique	10°	20°	30°	30°	50°	60°	70°	80°	90°	95°
Solution d'émulsine à 20 0/0	— 0°8'	— 0°6'	— 0°4'	— 0°4'	— 0°4'	— 0°4'	— 0°2'	± 0°	± 0°	± 0°

Ces déviations ont été ajoutées respectivement aux résultats des lectures faites après addition d'émulsine.

Le tableau IV donne l'ensemble des valeurs obtenues après la correction qui vient d'être indiquée.

TABLEAU IV (1).

Synthèse de l'éthylglucoside β dans des alcools éthyliques de différents titres
(Titre volumétrique).

l = 2	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Alcool à ...	10°	20°	30°	40°	50°	60°	70°	80°	90°	95°
0 jour (2)	+0°58'	+1° 2'	+1° 4'	+1° 6'	+1° 6'	+1° 8'	+1° 8'	+1°10'	+1°10'	+1°10'
4 jours	+0°56'	+0°56'	+0°50'	+0°48'	+0°44'	+0°40'	+0°36'	+0°24'	+0°36'	+1° 6'
8 —	+0°52'	+0°44'	+0°36'	+0°34'	+0°32'	+0°28'	+0°12'	0°	+0°12'	+1° 4'
12 —	+0°52'	+0°44'	+0°36'	+0°32'	+0°24'	+0°18'	+0° 6'	-0°10'	-0° 4'	+0°50'
16 —	+0°52'	+0°44'	+0°36'	+0°32'	+0°26'	+0°14'	0°	-0°12'	-0°18'	+0°50'
24 —	—	—	—	—	+0°18'	+0°10'	0°	-0°16'	-0°30'	+0°36'
32 —	—	—	—	—	+0°18'	+0°10'	0°	-0°16'	-0°30'	+0°28'
48 —	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0°
140 —	—	—	—	—	—	—	—	—	—	-0°42'

L'examen des résultats obtenus nous permet de faire quelques remarques intéressantes :

Rapidité de la réaction. — *La rapidité* avec laquelle se fait la réaction synthétisante dépend du degré alcoolique ; elle est plus grande à mesure que le titre alcoolique s'élève, toutefois pour les huit premiers échantillons seulement. Dans l'alcool à 90° la réaction est plus lente à se mettre en train, et enfin dans l'alcool à 95° nous n'avons,

(1) BOURQUELOT et BRIDEL ont déjà fait des expériences analogues que l'on retrouvera relatées dans le *Journ. de Pharm. et de Chim.* (7), p. 167; 1912. Il est facile de voir par les résultats que ces auteurs ont obtenus la concordance qui existe avec les chiffres ci-dessus.

(2) Le glucose n'a pas été pesé avec une précision extrême ce qui explique les rotations un peu faibles de certains échantillons.

au bout de huit jours, qu'une différence de 6° avec la rotation initiale.

Durée. — La fin de la réaction, elle aussi, est atteinte au bout d'un temps plus ou moins long, suivant le degré alcoolique. Il est difficile de fixer le jour précis où la réaction est terminée, car une erreur de 2' peut être facilement commise dans une lecture polarimétrique, et il a fallu s'assurer de l'arrêt de la réaction par trois lectures identiques faites à quatre jours d'intervalle l'une de l'autre. Quoi qu'il en soit, il est facile de voir que plus l'alcool est faible, plus vite la fin de la réaction est atteinte. Dans l'alcool à 95°, il a fallu attendre plus de quatre mois. Enfin, plus le titre alcoolique est élevé, plus la rotation va vers la gauche.

Limite. — Pour étudier avec précision la limite de cette réaction, il était préférable de ne pas se contenter du seul examen polarimétrique, mais de doser par voie chimique le glucose restant dans chaque échantillon. Le dosage du sucre réducteur, à l'arrêt de la réaction, a donné les résultats suivants :

TABLEAU V.

Sucre réducteur restant après arrêt de la réaction dans les divers alcools.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Titre alcoolique	10°	20°	30°	40°	50°	60°	70°	80°	90°	95°
Sucre réducteur restant p. 100 cm ³	0gr846	0gr802	0gr794	0gr682	0gr598	0gr536	0gr456	0gr283	0gr212	0gr112

Ces dosages accusent la disparition d'une certaine quantité de glucose. La quantité de sucre restant est d'autant

plus faible que le liquide alcoolique est d'un titre plus élevé. Corrélativement, il s'est donc combiné plus de glucose dans les alcools forts que dans les alcools faibles. De cette seule expérience on peut donc conclure qu'il y a pour chaque degré alcoolique un état d'équilibre où la synthèse s'arrête. Cet état d'équilibre est aussi celui qu'atteint l'hydrolyse de l'éthylglucoside β dans le même milieu. C'est ce que BOURQUELOT et BRIDEL (1) ont bien démontré d'ailleurs en observant dans les alcools éthyliques à 60° et 85° la synthèse et l'hydrolyse de quantités correspondantes de glucose d. et d'éthylglucoside β . Ils ont constaté dans les deux cas, à l'arrêt de la réaction, un état d'équilibre tel que les mélanges correspondants possédaient alors une composition identique.

Nous reproduisons ci-dessous les chiffres auxquels a conduit cette expérience fondamentale au point de vue de la preuve de la réversibilité des actions fermentaires.

EXPÉRIENCE A₁ — *Hydrolyse*.
Ethylglucoside β 0 gr., 5816
Alcool à 85° Q. S. p. 50 cm³.

EXPÉRIENCE A₂ — *Synthèse*.
Glucose 0 gr., 5033
Alcool à 85° Q. S. p. 50 cm³.

EXPÉRIENCE B₁ *Hydrolyse*.
Ethylglucoside β 0 gr., 5807
Alcool à 60° Q. S. p. 50 cm³.

EXPÉRIENCE B₂ — *Synthèse*.
Glucose 0 gr., 5025
Alcool à 60° Q. S. p. 50 cm³.

Les proportions de glucose étaient dans A₂ et B₂ respectivement égales à celles qui entraient dans la composition du glucoside de A₁ et B₁ ; on a ajouté à chacune de ces solutions 0 gr., 20 % d'émulsine.

Le liquide A₁ accusait au départ une rotation de — 0°48'
— A₂ — — — + 1° 4

(1) Synthèse de glucosides d'alcools à l'aide de l'émulsine. — La réversibilité des actions fermentaires (*Journ. de Pharm. et de Chimie*, (7), VI, 168, 1912).

Lorsque la réaction s'est arrêtée au bout de trois semaines environ, les deux liquides A accusaient la même rotation de $-20'$.

De même dans les expériences B₁ et B₂ la solution s'était fixée pour les deux liquides, au bout de trois semaines, à $+0^{\circ}10'$.

Le dosage du sucre réducteur donnait également les mêmes résultats dans les expériences A₁ et A₂ d'une part, B₁ et B₂ d'autre part.

Bien que cette expérience n'ait été faite qu'avec les alcools à 60° et à 85°, on peut cependant conclure, sans crainte d'erreur, qu'il existe pour chaque degré alcoolique, comme pour ces deux derniers, un état d'équilibre à partir duquel toute synthèse devient impossible ; en effet, l'éthylglucoside β formé en excès serait immédiatement hydrolysé de façon à maintenir à sa valeur, fixée par la composition du milieu, le rapport constant qui existe entre la quantité de glucose restant et celle de l'éthylglucoside β formé.

On peut représenter graphiquement cet état d'équilibre propre à chaque degré alcoolique par une courbe. Pour établir cette courbe, j'ai porté en ordonnées les titres des alcools éthyliques et en abscisses les poids de glucose combiné. J'ai construit une première courbe avec les données fournies par les essais dont j'ai parlé précédemment, mais j'ai constaté que cette courbe présente quelques irrégularités. A l'examen, il est apparu que ces irrégularités devaient provenir de ce que j'ai utilisé des alcools dont le titrage avait été réalisé en volume. On sait, en effet, que lorsqu'on mélange de l'eau à de l'alcool éthylique, il se produit une contraction, de grandeur d'ailleurs variable suivant la proportion réciproque des deux liquides. Il s'ensuit que, dans des mélanges alcooliques dont le titre est exprimé en volume, les nombres relatifs des molécules d'eau et d'alcool ne sont pas rigoureusement proportionnels aux titres indiqués.

Pour éviter cette cause d'erreur, j'ai institué une nouvelle série d'expériences analogue à celle dont les résultats ont été relatés au Tableau IV, mais au lieu de préparer les alcools éthyliques de divers titres en volume, je les ai préparés en poids. J'ai donc opéré sur des mélanges obtenus en faisant dissoudre 1 gramme de glucose dans 100 cm³ d'alcool contenant 10, 20, 30 gr., etc. d'alcool pur pour 100 grammes de liqueur. Pour ne pas compliquer outre mesure le tableau ci-dessous, je n'ai pas relaté les nombreuses rotations observées au cours de la marche de la réaction, mais seulement celles qui correspondaient à l'état d'équilibre, à l'arrêt de celle-ci, ces derniers chiffres seuls étant nécessaires à l'établissement de la courbe.

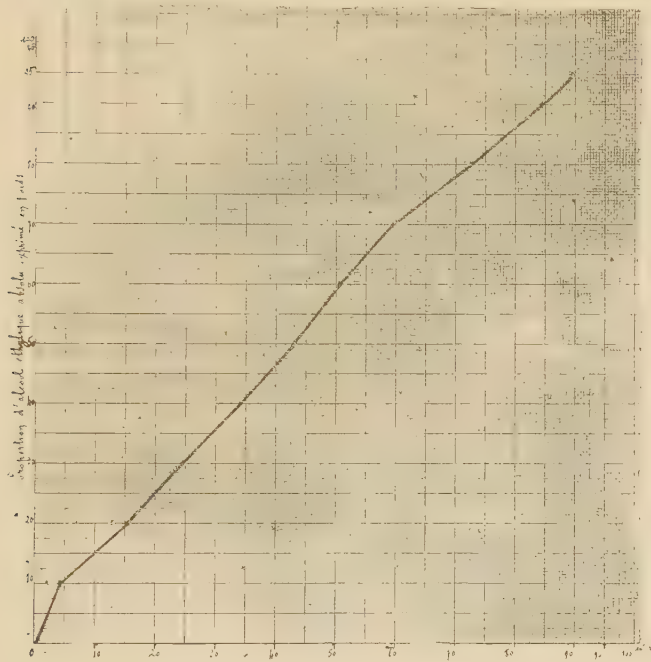
TABLEAU VI.

Synthèse de l'éthylglucoside β dans des alcools éthyliques de différents titres (titre pondéral).

PROPORTION d'alcool absolu contenu dans les mélanges exprimé en poids	ROTATION initiale l=2	ROTATION à l'arrêt l=2	SUCRE réducteur à l'arrêt	DURÉE de la réaction
10 pour 100	+ 1°2'	+ 0°46'	0,9575	16 jours
20 — —	+ 1°2'	+ 0°36'	0,8440	32 —
30 — —	+ 1°4'	+ 0°24'	0,7552	32 —
40 — —	+ 1°4'	+ 0°18'	0,6600	32 —
50 — —	+ 1°4'	+ 0°10'	0,5710	32 —
60 — —	+ 1°4'	0	0,4970	32 —
70 — —	+ 1°6'	— 0°10'	0,4040	32 —
80 — —	+ 1°6'	— 0°24'	0,2761	32 —
90 — —	+ 1°8'	— 0°38'	0,1550	98 —
95 — —	+ 1°8'	— 0°42'	0,1050	200 —

Les chiffres de la quatrième colonne indiquent la quantité de glucose restant à l'arrêt de la réaction.

En retranchant de 1 gramme, représentant le poids de glucose mis au début, chacune de ces quantités, je saurai quel poids de glucose s'est combiné à l'alcool. Connaissant donc la quantité de glucose combiné à la fin de la réaction, j'ai construit la courbe figurée ci-dessous.



Cette courbe est la courbe des synthèses ; elle est également celle des hydrolyses, d'après ce qui a été dit plus haut.

La courbe s'élève rapidement jusqu'à l'alcool à 10 gr. pour 100, puis elle devient droite jusqu'à l'alcool à 70°. Enfin, elle se rapproche de l'horizontale sans pouvoir atteindre

la ligne représentant l'alcool absolu : la synthèse ne pouvant se produire dans l'alcool pur.

En résumé, cette série d'essais nous montre nettement l'influence du titre alcoolique sur la marche de la synthèse, toutes autres conditions restant les mêmes : 1 gr. de glucose pour 100 cm³ ; émulsine 0 gr., 20 pour 100 cm³ ; température 16 à 18°. Dans les essais qui vont suivre, on va étudier l'influence des variations de la température.

CHAPITRE III.

Influence de la température sur la marche de la synthèse.

J'ai préparé, avec des alcools de degrés centésimaux différents (10°, 20°, 30°, etc.), de nouvelles séries d'essais semblables à ceux relatés au Tableau III, et j'ai maintenu ensuite chaque série à des températures déterminées. Pour obtenir une plus grande précision dans la comparaison des résultats, j'ai préparé, pour chaque titre alcoolique, une solution mère contenant 1 gr. de glucose pour 100 cm³ en quantité suffisante pour servir à tous les essais d'une même série. Cette solution mère m'a permis de placer aux différentes températures des échantillons rigoureusement identiques ; cette façon de procéder m'a donné également la possibilité de simplifier l'exposé des résultats, puisqu'il suffit, dans le tableau, d'indiquer une fois pour toutes, pour chaque degré alcoolique, la déviation initiale des liquides placés aux diverses températures. Pour faciliter la comparaison des résultats, j'ai cherché à réunir en un seul tableau les chiffres obtenus ; j'ai été, en conséquence, obligé de supprimer tous les chiffres qui avaient trait à la marche de la réaction depuis le quatrième jour jusqu'à l'arrêt de celle-ci. La correction provenant de la dissolution partielle de l'émulsine a été faite comme pré-

cédemment (Tableau III) ; elle est la même, quelle que soit la température. Je rappelle ce que j'ai dit au Chapitre II : le glucose n'a pas été pesé avec une précision extrême, ce qui explique la déviation un peu faible obtenue pour certains échantillons ; cela n'a d'ailleurs aucune importance relativement à la précision des résultats finaux, puisque, comme on l'a dit, c'est la même solution mère qui a servi à la préparation de tous les échantillons d'une même série.

Les essais ont donc été effectués à quatre températures différentes, $+16^{\circ}$ (1), $+30^{\circ}$, $+40^{\circ}$ et $+50^{\circ}$.

L'examen des chiffres du tableau ci-contre nous permet de faire des remarques intéressantes :

Rapidité. — Nous avons vu, précédemment, que la rapidité de la réaction dépendait du degré alcoolique : elle dépend aussi de la température.

Si nous laissons pour le moment de côté l'étude de la réaction à la température de $+50^{\circ}$, dont on reparlera plus loin, nous voyons qu'à $+30^{\circ}$ et $+40^{\circ}$ la réaction marche bien plus vite qu'à la température ordinaire.

Cette action favorisante est d'autant plus marquée que l'on s'élève sur l'échelle des degrés alcooliques. En quatre jours, à $+40^{\circ}$, la déviation de l'échantillon renfermant 1 gr. de glucose pour 100 cm³ d'alcool à 90° est passé de $+1^{\circ}10'$ à $-0^{\circ}16'$, alors qu'à la température ordinaire la rotation n'avait franchi que 34' vers la gauche.

Durée. — Par ce fait même, la durée de la réaction est considérablement diminuée pour les alcools forts à $+30^{\circ}$ et $+40^{\circ}$. La synthèse est arrêtée dans l'alcool à 95°, à la température de $+40^{\circ}$, au bout de vingt jours, alors qu'il avait fallu plus de quatre mois à la température du laboratoire (16°) pour obtenir le même résultat.

(1) Les chiffres indiqués pour $+16^{\circ}$ ont été empruntés au Tableau IV.

Limite. — Comme on pouvait le supposer *a priori*, la température n'a aucune influence sur la limite de la réaction tant que l'émulsine n'est pas altérée par cette température.

Il faut, au sujet des alcools faibles, remarquer que, déjà à la température de $+40^{\circ}$, l'action de l'émulsine semble légèrement entravée. Si quelques minutes seulement séparent les résultats finaux, il n'en est pas moins vrai qu'on ne trouve plus la concordance parfaite de la limite de la réaction observée à $+16^{\circ}$ et $+30^{\circ}$.

Le dosage du sucre réducteur aboutit sensiblement aux mêmes résultats, et, à $+40^{\circ}$, on remarque aussi que, dans les alcools faibles, nous trouvons un peu plus de sucre réducteur. L'influence de cette température se fait déjà sentir sur l'émulsine. Dans les alcools forts, à partir de 90° , les résultats sont rigoureusement identiques à $+16^{\circ}$, $+30^{\circ}$ et $+40^{\circ}$; nous voyons par là que, dans ces échantillons, l'état d'équilibre est bien le même, quelle que soit la température.

Examinons maintenant les échantillons placés dans l'étuve à 50° . Dans ces milieux alcooliques, la déviation des huit premiers s'est à peine modifiée ; l'émulsine n'a pu résister à cette température et a été tuée presque immédiatement. Le dosage du sucre réducteur nous fait retrouver presque tout le glucose mis au début.

Au contraire, dans l'alcool à 90° , 40 pour 100 environ du glucose s'est combiné. On verra, dans le chapitre suivant, qu'en doublant la quantité d'émulsine, la combinaison pourra dépasser 50 pour 100 ; c'est que, dans ce cas, l'affaiblissement de l'émulsine se faisant graduellement, la réaction synthétisante pourra se poursuivre plus longtemps.

Dans l'alcool à 95° , à $+50^{\circ}$, la réaction est rapide et atteint presque le point d'équilibre déterminé pour cet

alcool à $+ 16^{\circ}$ (85 pour 100 de glucose combiné au lieu de 89 environ) (1).

En résumé, deux facteurs ont varié dans les essais précédents : le degré alcoolique et la température, toutes autres conditions étant les mêmes : solution de glucose à 1 gr. pour 100 cm³, émulsine 0 gr., 20 pour 100 cm³.

Les essais suivants porteront sur l'influence de la quantité d'émulsine utilisée dans la réaction.

(1) BOURQUELOT et BRIDEL ont étudié quelle était la température de destruction de l'émulsine dans des alcools éthyliques de différents titres (*Journal de Pharm. et Chim.* (7), VII, p. 27) et la résistance à l'action de la chaleur de l'émulsine en contact avec les alcools forts (70°, 80°, 90°, 95° et 100°) (*Journ. de Pharm. et de Chim.* (7), VII, p. 55). Ces auteurs ont démontré que la température de 50° avait une influence nocive sur le ferment et que la résistance du ferment à la température augmentait dans les alcools forts. Nos résultats signalés ci-dessus sont en parfaite concordance avec les observations de ces auteurs.

CHAPITRE IV.

Influence de la proportion de ferment sur la limite atteinte par la réaction synthétisante (1).

Comme on vient de le voir, la température de $+30^{\circ}$ paraît réaliser une condition très favorable à la synthèse ; aussi est-ce à cette température qu'on a institué, pour étudier l'influence de la quantité de ferment sur la marche de la réaction, deux séries d'expériences : d'une part 10 échantillons d'alcools éthyliques de différents titres tenant en solution 1 gr. de glucose pour 100 cm³ ont été additionnés de 0 gr., 20 d'émulsine pour 100 cm³ ; d'autre part, dix autres échantillons semblables ont été additionnés de 0 gr., 40 d'émulsine. Comme dans les expériences précédentes, il était surtout important d'avoir un point de départ constant ; c'est ce qui a été obtenu en faisant, pour chaque degré alcoolique, une solution mère commune aux deux essais.

Les vingt flacons des deux séries ont été placés à l'étuve à $+30^{\circ}$ et agités de temps en temps.

Les lectures ont été faites tous les quatre jours et l'on a effectué comme précédemment la correction relative à la dissolution partielle de l'émulsine.

(1) Une partie des recherches exposées dans ce chapitre a été faite en collaboration avec M. BOURQUELOR. Données nouvelles sur la réversibilité de l'action fermentaire de l'émulsine (*Journ. Pharm. et Chim.*, (7), VII, 236-244, 1913).

On n'a noté, dans le Tableau VIII, que les résultats finaux, se réservant de revenir avec plus de détails sur la marche de la réaction qui sera étudiée au cours d'autres expériences.

TABLEAU VIII.

Synthèse de l'éthylglucoside β en présence de 0 gr., 20 et de 40 gr., 40 d'émulsine pour 100 cm³.

Titre alcoolique	DÉVIATION initiale	DÉVIATION finale	DÉVIATION finale	DURÉE de l'expérience
		Emulsine 0 gr., 20	Emulsine 0 gr., 40	
10°.....	+ 0° 58'	+ 0° 50'	+ 0° 50'	4 jours
20°.....	+ 1° 2'	+ 0° 46'	+ 0° 44'	4 —
30°.....	+ 1° 4'	+ 0° 36'	+ 0° 36'	8 —
40°.....	+ 1° 6'	+ 0° 30'	+ 0° 30'	8 —
50°.....	+ 1° 6'	+ 0° 20'	+ 0° 20'	12 —
60°.....	+ 1° 8'	+ 0° 14'	+ 0° 14'	12 —
70°.....	+ 1° 8'	+ 0° 2'	+ 0° 2'	12 —
80°.....	+ 1° 10'	— 0° 14'	— 0° 10'	12 —
90°.....	+ 1° 10'	— 0° 30'	— 0° 30'	12 —
95°.....	+ 1° 10'	— 0° 40'	— 0° 40'	36 —

Ces résultats, que l'on peut considérer comme parfaitement identiques, semblent bien prouver qu'une quantité double d'émulsine ne fait pas varier l'état d'équilibre dans un milieu donné, et que cet état d'équilibre ne dépend, comme on l'a déjà dit, que des proportions des composants

du glucoside qui sont dans la liqueur : dans l'espèce, des proportions de l'alcool seulement.

Nous trouvons ici une preuve bien nette à l'appui de la théorie de la réversibilité. Dans les expériences de BOURQUELOT et BRIDEL que nous avons rappelées précédemment, on avait déjà vu qu'il existait, pour chaque milieu alcoolique déterminé, un état d'équilibre fixe où hydrolyse et synthèse s'arrêtent au même point.

BOURQUELOT, HÉRISSEY et BRIDEL (1) avaient aussi montré que le pouvoir synthétisant de la levure basse desséchée qui effectue la synthèse biochimique du méthylglucoside α est détruit dans un alcool méthylique d'un degré supérieur à 40°; et, corrélativement, ils avaient observé que le pouvoir hydrolysant de cette levure sur le même glucoside est également détruit dans le même alcool : il semblait donc que l'on pouvait dire, là encore, que c'est bien le même ferment qui agit comme synthétisant et comme hydrolysant.

Enfin, dans le tableau que nous avons reproduit précédemment, nous voyons que l'état d'équilibre pour un alcool de titre donné est fixe, que la quantité d'émulsine soit simple ou double. C'est donc un argument de plus en faveur de la réversibilité de l'action fermentaire de l'émulsine.

Dans les expériences ci-dessous où on a suivi au moyen du polarimètre la marche de la réaction au cours des essais, on pourra faire les mêmes remarques au sujet de la limite de l'action synthétisante ; on verra seulement que la quantité d'émulsine mise en jeu, si elle n'influe pas sur cette limite, a toutefois une assez grande importance au point de vue de la rapidité et la durée de la réaction.

Six échantillons contiennent chacun 1 gr. de glucose pour 100 cm³ d'alcool éthylique à 90° ; ils sont divisés en

(1) *Journ. de Pharm. et de Chim.*, (7), VII, p. 235.

TABLEAU IX.

Synthèse effectuée à des températures croissantes et avec une quantité simple ou double d'émulsine.

	TEMPÉRATURE + 30°		TEMPÉRATURE + 40°		TEMPÉRATURE + 50°	
	0 gr., 20 d'émulsine	0 gr., 40 d'émulsine	0 gr., 20 d'émulsine	0 gr., 40 d'émulsine	0 gr., 20 d'émulsine	0 gr., 40 d'émulsine
0 jour.....	+ 1° 8'	+ 1° 8'	+ 1° 8'	+ 1° 8'	+ 1° 8'	+ 1° 8'
1 —	+ 0° 42'	+ 0° 30'	+ 0° 26'	+ 0° 20'	+ 0° 40'	+ 0° 30'
2 jours.....	+ 0° 26'	+ 0° 8'	+ 0° 4'	+ 0°	+ 0° 30'	+ 0° 20'
3 —	+ 0° 8'	+ 0° 8'	+ 0° 8'	— 0° 10'	+ 0° 24'	+ 0° 16'
4 —	— 0° 8'	— 0° 14'	— 0° 14'	— 0° 18'	+ 0° 22'	+ 0° 14'
5 —	— 0° 12'	— 0° 20'	— 0° 20'	— 0° 22'	+ 0° 22'	+ 0° 12'
6 —	— 0° 16'	— 0° 22'	— 0° 22'	— 0° 24'	+ 0° 20'	+ 0° 10'
7 —	— 0° 20'	— 0° 24'	— 0° 24'	— 0° 24'	+ 0° 20'	+ 0° 8'
8 —	— 0° 20'	— 0° 24'	— 0° 24'	— 0° 26'	+ 0° 18'	+ 0° 6'
12 —	— 0° 24'	— 0° 26'	— 0° 26'	— 0° 26'	+ 0° 18'	+ 0° 2'
24 —	— 0° 24'	— 0° 26'	— 0° 26'	— 0° 26'	+ 0° 14'	— 0° 2'
32 —	— 0° 24'	— 0° 26'	— 0° 26'	— 0° 26'	+ 0° 12'	— 0° 12'
Sucre réducteur à l'arrêt.....	0 gr., 228	0 gr., 231	0 gr., 231	0 gr., 231	0 gr., 622	0 gr., 461

trois groupes de deux, chaque groupe est placé respectivement dans des étuves aux températures de $+ 30^{\circ}$ $+ 40^{\circ}$ et $+ 50^{\circ}$; pour chaque température, un flacon contient 0 gr. 20 et l'autre 0 gr. 40 d'émulsine. La réaction synthétisante est suivie par des lectures polarimétriques faites chaque jour à la même heure. Nous exprimons ces résultats dans le Tableau IX.

Les résultats inscrits à ce tableau sont suffisamment explicites pour qu'il soit inutile d'y insister longuement, je me bornerai donc seulement à quelques remarques sur deux ou trois points spéciaux.

Examinons d'abord les flacons ayant séjourné dans les étuves à $+ 30^{\circ}$ et $+ 40^{\circ}$. A $+ 30^{\circ}$ avec 0 gr., 20 d'émulsine, en 24 heures, on observe un retour vers la gauche de $26'$; à $+ 40^{\circ}$, et avec 0 gr., 40 d'émulsine, nous avons, dans le même temps, un retour vers la gauche de $48'$, soit $22'$ de plus; la différence s'accroît encore le deuxième jour, puis diminue à partir du troisième jour. Après le quatrième jour, le retour vers la gauche est plus grand dans le premier échantillon. Au bout de huit jours, l'action synthétisante est arrivée à un terme à peu près semblable dans chaque échantillon; enfin, au bout de douze jours, l'équilibre est complètement atteint. On pratique le dosage du sucre réducteur non combiné, et on trouve dans le premier échantillon 0 gr., 228 de glucose non combiné, et dans les trois autres 0 gr., 231: ce sont donc là des résultats pratiquement identiques qui viennent consolider encore les conclusions que nous avons tirées des premières expériences de ce chapitre.

L'examen des résultats fournis par les échantillons placés dans l'étuve à 50° , montrent qu'à cette température, et bien que nous soyons dans un alcool fort, l'action de l'émulsine est considérablement amoindrie par ce fait qu'elle est partiellement détruite: en met-on une plus grande quantité, la réaction peut se poursuivre un peu

plus loin, mais la limite de la réaction ne peut être atteinte à cause de l'affaiblissement du ferment.

J'ai fait varier dans les essais précédents le degré alcoolique, la température, la quantité d'émulsine; nous verrons maintenant à quels résultats on est conduit en faisant varier la proportion de glucose.

CHAPITRE V.

Variations suivant la proportion de glucose.

Dans les essais méthodiques qui ont été relatés jusqu'ici, la proportion de glucose utilisée dans les expériences était la même (1 gr. pour 100 cm³).

Il restait, pour étudier l'action synthétisante de l'émulsine sur le glucose en solution dans l'alcool éthylique, à faire varier la proportion de glucose par rapport au dissolvant. J'ai d'abord fait des essais avec des solutions à 2 gr., 4 gr., et 6 gr., de glucose pour 100 cm³. On pouvait théoriquement supposer que, dans ces conditions, la réaction synthétisante se poursuivrait suivant le mode déjà décrit et qu'en particulier l'état d'équilibre entre le glucose consommé et l'éthylglucoside formé resterait constant ; en effet, la proportion de glucose d'une part, et celle du glucoside produit d'autre part, devaient encore se trouver en quantité relativement faible par rapport à la grande masse du dissolvant. Cependant, ce raisonnement devait être soumis à la vérification expérimentale.

Pour dissoudre le glucose, j'ai choisi l'alcool à 70° ; cet alcool permet, en effet, de dissoudre d'assez grandes proportions de sucre ; la réaction s'y poursuit assez loin et marche rapidement.

En employant dans diverses séries d'essais des quantités variables d'émulsine, j'ai pensé à vérifier une fois de plus que la quantité de l'émulsine n'influe en aucune circonstance sur l'équilibre de la réaction ; j'ai donc préparé de la façon suivante trois séries de trois échantillons chacun :

PREMIÈRE SÉRIE.

La première série a été préparée à partir d'une solution mère contenant 2 gr. de glucose pour 100 cm³ d'alcool à 70°. A chacun des trois flacons contenant 100 cm³ de solution, on ajoute respectivement 0 gr., 20, 0 gr., 40 et 0 gr., 60 d'émulsine.

DEUXIÈME SÉRIE.

La deuxième série est préparée à partir d'une solution mère contenant 4 gr. de glucose pour 100 cm³ d'alcool à 70° ; à chacun des trois flacons, on ajoute également 0 gr., 20, 0 gr., 40 et 0 gr., 60 d'émulsine pour 100 cm³.

TROISIÈME SÉRIE.

Enfin, la troisième série est préparée à partir d'une solution mère contenant 6 gr. de glucose pour 100 cm³ d'alcool à 70°. A chacun des trois flacons, on ajoute 0 gr., 20, 0 gr., 40 et 0 gr., 60 d'émulsine.

Les flacons de ces trois séries sont abandonnés à la température du laboratoire et agités de temps en temps.

TABLEAU X.

Synthèses effectuées en présence de quantités croissantes de glucose et d'émulsine.

DATE	SOLUTION A 2 GR. DE GLUCOSE				SOLUTION A 4 GR. DE GLUCOSE				SOLUTION A 6 GR. DE GLUCOSE			
	Emulsine				Emulsine				Emulsine			
	0 gr., 20	0 gr., 40	0 gr., 60		0 gr., 20	0 gr., 40	0 gr., 60		0 gr., 20	0 gr., 40	0 gr., 60	
0 jours	+ 2° 12'	+ 2° 12'	+ 2° 12'		+ 4° 24'	+ 4° 24'	+ 4° 24'		+ 6° 40'	+ 6° 40'	+ 0° 40'	
4 —	+ 1° 6'	+ 1°	+ 0° 54'		+ 2° 40'	+ 2° 16'	+ 2° 8'		+ 4° 4'	+ 3° 48'	+ 3° 42'	
8 —	+ 0° 32'	+ 0° 28'	+ 0° 22'		+ 1° 30'	+ 1° 2'	+ 0° 56'		+ 2° 28'	+ 2° 6'	+ 2°	
12 —	+ 0° 16'	+ 0° 8'	+ 0° 8'		+ 0° 52'	+ 0° 30'	+ 0° 28'		+ 1° 28'	+ 1° 12'	+ 1° 6'	
16 —	+ 0° 8'	+ 0° 6'	+ 0° 2'		+ 0° 28'	+ 0° 12'	+ 0° 10'		+ 0° 50'	+ 0° 38'	+ 0° 36'	
20 —	+ 0° 2'	+ 0° 2'	+ 0° 2'		+ 0° 16'	+ 0° 8'	+ 0° 6'		+ 0° 30'	+ 0° 24'	+ 0° 18'	
28 —	+ 0° 2'	+ 0° 2'	+ 0° 2'		+ 0° 6'	+ 0° 4'	+ 0° 2'		+ 0° 12'	+ 0° 8'	+ 0° 6'	
36 —	+ 0° 2'	+ 0° 2'	+ 0° 2'		+ 0° 2'	0°	+ 0° 2'		+ 0° 4'	+ 0° 2'	+ 0° 2'	
80 —	+ 0° 2'	+ 0° 2'	+ 0° 2'		0°	0°	0°		0°	0°	0°	

Rapidité. — Au début de la réaction, comme il est facile de le remarquer, plus la quantité de glucose est grande, plus la réaction est rapide. Dans l'échantillon qui contient 6 gr. de glucose pour 100 cm³, nous obtenons, avec 0 gr., 60 d'émulsine, un retour de 3° vers la gauche en quatre jours. La quantité d'émulsine, comme dans les autres autres expériences, intervient donc comme facteur de rapidité ; toutefois, la différence de rapidité est à peine appréciable entre les échantillons semblables contenant 0 gr., 40 et 0 gr., 60 d'émulsine ; il semble bien qu'à partir d'une certaine proportion de ferment il n'y ait pas d'intérêt à augmenter la quantité de ce dernier.

Durée. — Plus la quantité de glucose à transformer est considérable, plus la réaction est longue à atteindre son terme. Malgré la grande rapidité de la réaction au début, il a fallu plus de deux mois pour que celle-ci soit complètement terminée dans les flacons ayant contenu 6 gr. de glucose pour 100 cm³.

Limite. — La limite de la réaction est la même, quelle que soit la quantité d'émulsine et de glucose mis en œuvre, au moins pour les petites quantités de glucose employées. En devait-il être de même si on augmentait considérablement la proportion de glucose ?

J'ai préparé, au moyen de la chaleur, trois nouveaux échantillons contenant respectivement 10, 15 et 20 gr. de glucose pour 100 cm³ d'alcool éthylique à 70° ; j'ai ajouté 0 gr., 40 d'émulsine pour 100 cm³. Il a été impossible de préparer des solutions de glucose plus concentrées ; en effet, dans des solutions possédant des concentrations supérieures, il se produit par refroidissement une cristallisation partielle du glucose. Les trois mélanges ont été abandonnés à la température du laboratoire (+ 18°) et agités de temps en temps. Ils m'ont permis de faire les constatations que je transcris ci-après.

TABLEAU XI.

Synthèse de l'éthylglucoside β à l'aide de solutions de glucose plus concentrées.

	SOLUTION à 10 gr. de glucose pour 100 cm ³	SOLUTION à 15 gr. de glucose pour 100 cm ³	SOLUTION à 20 gr. de glucose pour 100 cm ³
0 jours	+ 11°10'	+ 16°50'	+ 22°22'
4 —	+ 7°34'	+ 13° 6'	+ 17°32'
28 —	+ 0°48'	+ 2°30'	+ 4° 6'
52 —	+ 0°28'	+ 1° 4'	+ 1°44'
68 —	+ 0°28'	+ 0°56'	+ 1°26'
89 —	+ 0°28'	+ 0°56'	+ 1°22'

Les mêmes remarques que précédemment peuvent être faites au sujet de la rapidité et de la durée de la réaction.

Dans la solution contenant 20 gr. de glucose, la rotation est passée de + 22°22' à + 17°32', soit un retour de 5° vers la gauche en quatre jours. La réaction, pour être complète dans cet échantillon, a demandé près de trois mois.

Pour étudier la limite de la réaction, nous avons résumé dans le tableau ci-après la quantité de glucose combiné pour 100 cm³ d'alcool à 70°, lorsque l'on emploie des quantités croissantes de glucose.

Dans la dernière colonne, on a indiqué la proportion de glucose combiné rapportée au poids de ce sucre existant primitivement dans la liqueur.

On verra relaté dans ce tableau les résultats obtenus avec des solutions contenant 2 gr., 50 et 5 gr. de glucose pour 100 cm³ d'alcool éthylique à 70°. Ces expériences ont été faites séparément des précédentes, ce qui fait qu'elles n'ont pas été relatées dans les Tableaux X et XI.

TABEAU XII.

Poids du glucose combiné par rapport au sucre primitivement en solution.

Quantité de glucose mis en œuvre pour 100 cm ³	Glucose combiné	Glucose combiné pour 100
1 gr.	0 gr.,544	54,40
2 gr.	1 gr.,088	54,40
2 gr.,50	1 gr.,364	54,56
4 gr.	2 gr.,185	54,50
5 gr.	2 gr.,681	53,36
6 gr.	3 gr.,220	53,66
10 gr.	5 gr.,380	53,80
15 gr.	8 gr.,100	54,00
20 gr.	10 gr.,640	53,20

L'examen de la deuxième colonne montre que la quantité de glucose combiné est proportionnelle à la quantité de sucre mis en œuvre. C'est ce que la lecture des chiffres de la dernière colonne nous montre avec la plus grande netteté, les valeurs rapportées à 100 parties de glucose étant pratiquement identiques.

Le rapport entre le glucose existant au début et le glucoside formé est donc le même. Par suite, la limite de la réaction est également la même. Cette limite, en définitive, ne dépend que d'un seul facteur : le degré alcoolique.

On peut écrire : $\frac{\text{glucose}}{\text{glucoside}} = C.$

C étant une constante propre à chaque degré alcoolique.

Il est donc évident que plus la quantité de glucose sera grande au début, plus il y aura de glucoside formé.

Puisqu'il en était ainsi, j'ai pensé qu'il y aurait avantage pour préparer beaucoup de glucoside à choisir un alcool plus fort qui donne une constante plus élevée ; mais cet alcool fort, l'alcool à 90° par exemple, ne peut dissoudre qu'une assez faible quantité de glucose ; j'ai pensé qu'il devait suffire, dans ces conditions, de laisser le glucose en excès, non dissous dans le flacon, et d'abandonner la réaction à elle-même pour voir le sucre se dissoudre dans le liquide à mesure que la réaction se poursuivrait.

J'ai donc préparé un mélange contenant 15 gr. de glucose pour 100 cm³ d'alcool à 90° et 0 gr., 50 d'émulsine ; un mélange de composition identique préparé dans les mêmes conditions avec cette différence seule qu'il ne contenait pas d'émulsine devait servir de témoin.

On a rassemblé ci-dessous les chiffres qui ont été fournis par les lectures polarimétriques successives pratiquées sur ces échantillons.

TABLEAU XIII.

Synthèse de l'éthylglucoside β dans l'alcool éthylique à 90° en présence de glucose en excès.

JOURS	FLACON contenant de l'émulsine	FLACON ne contenant pas d'émulsine
Rotation au bout de 4 jours...	+ 2°	+ 3°30'
— — 8 — ...	— 0° 6'	+ 3°10'
— — 12 — ...	— 1° 8'	+ 3°20'
— — 20 — ...	— 2°18'	+ 2°44'
— — 32 — ...	— 3°	+ 2°14'
— — 56 — ...	— 4°10'	+ 2° 4'
— — 90 — ...	— 4°30'	+ 2° 2'
— — 160 — ...	— 5°28'	+ 2° 6'

D'après le calcul, nous devons, à la fin de la réaction, aboutir à une déviation d'environ $-5^{\circ}50'$ correspondant à l'état d'équilibre conditionné par le titre du milieu alcoolique. Nous nous sommes arrêtés, après plus de cinq mois, à une déviation voisine : $-5^{\circ}28'$.

La réaction a été très lente ; mais il faut remarquer qu'elle était rendue moins facile par ce fait que, d'une part, environ 3 grammes seulement de glucose pour 100 cm^3 étaient dissous à la fois, et que, d'autre part, l'accumulation de l'éthylglucoside β formé devait nuire à la rapidité de la glucosidification. Le sucre primitif avait presque entièrement disparu.

On remarquera que le témoin qui accusait $+3^{\circ}30'$, au début, a vu sa rotation s'abaisser à $+2^{\circ}$ par la suite. Cette particularité peut provenir de diverses causes faciles à concevoir : la multirotation du glucose diminue très lentement dans l'alcool de titre élevé ; les variations de température déterminent des variations corrélatives très importantes de la solubilité du glucose dans l'alcool, de telle sorte que le titre de la solution peut, de ce fait, varier dans de très larges limites.

Nous reviendrons plus loin sur cette expérience de synthèse qui, intéressante au point de vue théorique, l'est beaucoup plus encore au point de vue pratique, puisqu'elle peut permettre de préparer, en quantité aussi grande qu'on le désire, un corps jusqu'ici peu courant dans les laboratoires.

CHAPITRE VI.

Synthèse de l'éthylglucoside β par l'émulsine en présence du phénol.

La présence de phénol dans des solutions éthyliques contenant du glucose et de l'émulsine devait-elle influencer sur les résultats de la synthèse ?

Le phénol devait-il paralyser dans une certaine mesure l'action de l'émulsine, ou devait-il, fait qui aurait été très intéressant, entrer en réaction et fournir du phénol glucoside β en même temps que de l'éthylglucoside β ?

Telles étaient les deux hypothèses que l'on pouvait faire *a priori* sur le rôle du phénol au cours de telles expériences. Or, ni l'une ni l'autre ne devaient se réaliser. Le phénol n'a aucune action nocive sur l'émulsine en présence d'un alcool fort et, pratiquement, quelle que soit la quantité de phénol employé. La limite de la réaction synthétisante de l'émulsine est la même, qu'il y ait ou non du phénol dans la solution.

J'ai préparé vingt échantillons contenant des doses croissantes de phénol, 1 gr., 2 gr., 4 gr., 6 gr., 8 gr., 10 gr... 38 gr. de phénol ; j'ai ajouté dans chaque flacon 1 gr. de glucose et complété le volume à 100 cm³ avec de l'alcool à 90°.

Les rotations des solutions ont été prises 24 heures après la dissolution : elles étaient toutes égales à $+1^{\circ}8'$. On a ajouté 0 gr., 20 d'émulsine dans chaque flacon et les mélanges abandonnés à la température du laboratoire ($+18^{\circ}$) ont été agités de temps en temps.

TABLEAU XIV.

Synthèse de l'éthylglucoside β en présence de phénol.

ÉCHANTILLONS contenant	ROTATION initiale	ROTATION finale	SUCRE réducteur restant
1 gr. de phénol.....	1° 8'	— 0°30'	0 gr.,212
2 — —	1° 8'	— 0°30'	0 gr.,212
4 — —	1° 8'	— 0°30'	0 gr.,212
6 — —	1° 8'	— 0°30'	0 gr.,211
8 — —	1° 8'	— 0°30'	0 gr.,210
10 — —	1° 8'	— 0°30'	0 gr.,212
12 — —	1° 8'	— 0°32'	0 gr.,211
14 — —	1° 8'	— 0°32'	0 gr.,211
16 — —	1° 8'	— 0°34'	0 gr.,212
18 — —	1° 8'	— 0°30'	0 gr.,212
20 — —	1° 8'	— 0°34'	0 gr.,213
22 — —	1° 8'	— 0°34'	0 gr.,213
24 — —	1° 8'	— 0°34'	0 gr.,212
26 — —	1° 8'	— 0°34'	0 gr.,212
28 — —	1° 8'	— 0°34'	0 gr.,213
30 — —	1° 8'	— 0°36'	0 gr.,215
32 — —	1° 8'	— 0°36'	0 gr.,215
34 — —	1° 8'	— 0°36'	0 gr.,213
36 — —	1° 8'	— 0°36'	0 gr.,213
38 — —	1° 8'	— 0°36'	0 gr.,214

Nous avons obtenu au bout de 32 jours environ l'arrêt de la réaction. Elle s'est faite entre $-0^{\circ}30'$ et $-0^{\circ}36'$. Si nous nous reportons à un échantillon contenant 1 gr. de glucose pour 100 cm³ d'alcool éthylique à 90° (Chapitre II) sans phénol, nous voyons que la réaction s'est arrêtée lorsque la déviation a atteint $-30'$. D'autre part, dans un tel échantillon, le dosage du sucre réducteur accusait un reste de glucose de 0 gr., 213.

Les résultats consignés au tableau ci-dessus sont donc pratiquement identiques à ceux que je viens de rappeler.

Pour conclure avec plus de certitude encore qu'il s'était formé de l'éthylglucoside β et ce glucoside seulement, j'ai réuni tous les échantillons de cet essai et j'en ai extrait le produit de la manière suivante : après avoir distillé l'alcool, j'ai repris plusieurs fois l'extrait par de l'eau et distillé chaque fois jusqu'à consistance d'extrait ; je suis arrivé de cette manière à entraîner complètement le phénol. J'ai ensuite soumis l'extrait étendu d'eau à la fermentation pour me débarrasser du glucose restant ; cette fermentation une fois terminée, j'ai distillé à sec dans le vide et repris par 300 cm³ d'acétone anhydre : la cristallisation s'est faite sur amorce d'éthylglucoside β . J'ai recueilli les cristaux et après les avoir essorés et séchés dans le vide sulfurique, j'en ai pris le pouvoir rotatoire :

$$\alpha_D = \frac{1,733 \times 20}{2 \times 0,4725} = -34^{\circ},5$$

$$(p = 0,4725 ; v = 20 ; l = 2 ; \alpha = -1^{\circ}44')$$

Le chiffre obtenu est un peu faible, comme on le verra plus loin ($-36^{\circ},5$). Ceci s'explique par ce fait que le produit n'a pas été purifié par recristallisation ; toutefois il semble que l'on puisse conclure avec certitude qu'il s'est formé de l'éthylglucoside β et ce glucoside seulement.

Il peut paraître surprenant que l'émulsine ne soit pas détruite en présence d'une solution contenant 38 gr. de

phénol pour 100 cm³. Faut-il conclure que le phénol n'a aucune action novice sur l'émulsine ? Cette conclusion est vraie pour des mélanges à base d'alcool à 90° dans lesquels si le phénol est en solution, l'émulsine, elle, n'est qu'en suspension. Verdon (1), en employant dans ses expériences l'alcool méthylique à 80°, a montré que l'addition d'une quantité de phénol supérieure à 18 gr. pour 100 cm³ de solution méthylique sucrée ralentit la réaction et peut même l'arrêter avant son terme.

D'autre part, si, au lieu d'employer comme véhicule de l'alcool à 90°, on emploie de l'eau, l'émulsine qui est alors en solution presque complète subit de la part du phénol un affaiblissement encore plus considérable. C'est là une remarque qui ressort d'autres essais que nous avons entrepris, M. BOURQUELOT, M. HÉRISSEY et moi, essais qui nous ont conduit à la synthèse du gentiobiose et qui sont relatés d'autre part (2).

Ces expériences avaient pour but d'étudier l'action synthétisante de l'émulsine sur une solution aqueuse concentrée de glucose. Or, nous avons trouvé qu'en ajoutant seulement 2 0/0 de phénol à de telles solutions, la réaction s'arrêtait avant d'avoir atteint la limite constatée dans des solutions témoins où le toluène remplaçait le phénol comme antiseptique. C'est là évidemment une circonstance qui empêchera la réalisation de la synthèse biochimique du phénol glucoside β par action directe de l'émulsine sur le phénol en présence de glucose.

(1) Contribution à l'étude de l'action synthétisante de l'émulsine. *Thèse doct. Universitaire*, page 40, Paris 1913.

(2) Synthèse biochimique d'un sucre du groupe des hexobioses, le gentiobiose ; *Journ. de Pharm. et Chim.*, 7, VIII, p. 441, 1913.

CHAPITRE VII.

Synthèse en présence d'un liquide neutre étranger à la réaction.

Le phénol dans les expériences précédentes avait constitué en solution alcoolique un milieu spécial étranger à la réaction ; ce milieu nouveau n'a pas eu d'influence sur la limite de la synthèse.

Si, au lieu d'agir en présence du phénol, on emploie comme milieu étranger à la réaction un liquide organique tel que l'acétone, on obtiendra des résultats semblables : j'ai effectué la synthèse biochimique de l'éthylglucoside β dans une solution contenant une forte proportion d'acétone et j'ai observé une action synthétisante en tous points semblable à celle qui se produit dans une solution ne contenant que du glucose et de l'alcool éthylique. J'ai, à cet effet, préparé à chaud, en quantité suffisante, une solution mère contenant :

Glucose.....	5 gr.
Alcool éthylique à 70°	Q. S. p. 100 cm ³

On a prélevé 100 cm³ que l'on a placé dans un flacon n° I avec 0 gr., 40 d'émulsine.

Le reste a servi à préparer les mélanges suivants :

Solution mère de glucose.	50 cm ³	{	flacon N ^o II
Acétone pure.....	Q. S. p. 100 cm ³		
Emulsine.....	0 gr. 40		
Solution mère de glucose.	50 cm ³	{	flacon N ^o III
Acétone pure.....	Q. S. p. 100 cm ³		
Emulsine.....	0 gr. 20		
Solution mère de glucose.	50 cm ³	{	flacon N ^o IV
Eau distillée.....	Q. S. p. 100 cm ³		
Emulsine.....	0 gr. 40		

Les déviations de ces liquides ont été prises dans le tube de deux décimètres avant l'addition d'émulsine (+16° à 18°).

TABLEAU XV.

Synthèse de l'éthylglucoside β en présence d'acétone.

DATE	I	II	III	IV
	Témoin	Acétone	Acétone	Témoin
	et Emulsine 0 gr.,40	et Emulsine 0 gr.,40	et Emulsine 0 gr.,20	étendu de 1/2 d'eau. Emulsine 0 gr.,40
Déviatiou initiale.....	+ 5°34'	+ 2°46'	+ 2°46'	+ 2°46'
Au bout de 2 jours ..	+ 4°16'	+ 2°10'	+ 2°26'	+ 2°
— 4 — ..	+ 2°58'	+ 1°30'	+ 1°56'	+ 1°20'
— 8 — ..	+ 1°30'	+ 0°44'	+ 1°14'	+ 0°40'
Déviatiou à l'arrêt....	0°	+ 0° 2'	0°	0°
Durée de la réaction..	42 jours	26 à 30 jours	34-38 jours	26-30 jours
Sucre réducteur à l'arrêt.....	2 gr.,33	1 gr.,14	1 gr.,14	1 gr.,20

La rapidité de la réaction ne peut être comparée que dans les échantillons contenant la même quantité de glucose, c'est-à-dire dans les flacons II, III et IV. On peut dire qu'elle est sensiblement égale pour les liquides contenant la même proportion d'émulsine.

Quant à la limite, elle est, d'après le polarimètre, identique pour tous les échantillons; le dosage du sucre réducteur nous donne également des résultats concordants.

BERTHELOT et PÉAN DE SAINT-GILLES (1), qui avaient essayé l'éthérification à 100° d'un mélange équivalent d'acide acétique et d'alcool, ont remarqué que la limite de l'éthérification n'était pas influencée s'ils ajoutaient quatre volumes de benzine au mélange. L'éthérification et la glucosidification se ressemblent par de nombreux points communs : celui-ci était intéressant à signaler. Il a déjà fait l'objet d'une remarque antérieure de BOURQUELOT et VERDON (2).

En même temps que l'expérience précitée, j'en ai effectué une autre de la façon suivante :

J'ai fait une solution contenant, pour 100 gr., 20 gr. d'eau et 80 gr. d'acétone. A cette solution j'ai ajouté du glucose de façon qu'il y en eût 2 gr. pour 100 cm³, puis cette dernière solution sucrée a servi à préparer les mélanges suivants :

1	{ Solution sucrée acétonique (2 gr p. 100 cm ³) 80 cm ³	
	Alcool éthylique absolu...	5 cm ³ = 5 × 0,79433 = 3 gr. 97
	Acétone à 80 pour 100... Q. S. p. 100 cm ³	
2	{ Solution sucrée acétonique 80 cm ³	
	Alcool éthylique absolu...	10 cm ³ = 10 × 0,79433 = 7 gr. 94
	Acétone à 80 pour 100... Q. S. p. 100 cm ³	

(1) Etat de dissolution dans un menstree étranger à la réaction. *Ann. de Chim. et de Phys.* (3) LXVI, p. 61, 1862.

(2) Recherches sur la synthèse biochimique du méthylglucoside β dans un liquide neutre étranger à la réaction. *Journ. de Pharm. et de Chim.* 7), VI, p. 482.

- { Solution sucrée acétonique 80 cm³
 3) Alcool éthylique absolu... 15 cm³=15×0,79433=11 gr.91
 Acétone à 80 pour 100.... Q. S. p. 100 cm³
 { Solution sucrée acétonique 80 cm³
 4) Alcool éthylique absolu.... 20 cm³=20×0,79433=15 gr.88
 Acétone à 80 pour 100.... Q. S. p. 100 cm³

Après vingt-quatre heures de contact et avant d'ajouter l'émulsine, j'ai voulu prendre la déviation de ces diverses solutions : cette opération a été impossible, car il s'était fait dans toutes les liqueurs une cristallisation de glucose. Je me suis donc contenté d'ajouter l'émulsine (0 gr., 40) et j'ai abandonné les mélanges à la température du laboratoire. La première lecture a été faite au bout de 16 jours, alors que toute trace de glucose avait disparu par redissolution.

TABLEAU XVI.

Examen de l'arrêt de la réaction en milieu acétonique.

Proportion d'alcool éthylique	5 cm ³	10 cm ³	15 cm ³	20 cm ³
Rotation au bout de 16 jours (l=2).....	+ 1°2'	+ 0°46'	+ 0°28'	+ 0°16'
Rotation à l'arrêt de la réaction.....	+ 1°2'	+ 0°44'	+ 0°24'	+ 0°10'
Durée de la réaction..	12 à 16 jours	24 à 30 jours	30 à 36 jours	30 à 36 jours
Glucose combiné pour 100 cm ³	0 gr.,366	0 gr.,556	0 gr.,658	0 gr.,780

La réaction synthétisante s'est donc effectuée dans un milieu très riche en acétone. Examinons donc si, dans ces conditions, la limite normale de la réaction a été atteinte.

Si nous ne tenons pas compte de l'acétone, mais seulement de la teneur respective du mélange en eau et alcool et de la quantité de sucre rapportée au volume total de chaque échantillon, nous pouvons connaître, d'après la courbe tracée au Chapitre III, le point d'équilibre de la réaction dans un pareil milieu.

L'acétone employé renferme 20 parties d'eau pour 100 en poids, ce qui correspond sensiblement à 17 gr., 5 pour 100 cm³; les mélanges contiennent donc respectivement 16 gr., 6 ; 15 gr., 7 ; 14 gr., 9 et 14 gr. d'eau ; nous savons la quantité d'alcool absolu en poids qui y est entré, on peut donc considérer les mélanges comme constitués par des alcools éthyliques à $\frac{3,97}{20,60}$ soit 19,27 pour 100 en poids ; $\frac{7,94}{23,70}$ soit 33,64 pour 100 en poids ; $\frac{11,91}{26,80}$ soit 44,44 pour 100 en poids et $\frac{15,88}{29,90}$ soit 53,11 pour 100 en poids. Si l'on se reporte à la courbe tracée pour représenter l'action de l'émulsine sur le glucose en solution dans des alcools éthyliques de différents titres, on voit que les chiffres obtenus reportés à une solution contenant seulement 1 gr. de glucose à l'origine, se rapprochent beaucoup de ceux que donne la courbe pour des alcools de mêmes titres. Malgré les légères différences que l'on peut constater, on peut dire une fois de plus que l'action synthétisante de l'émulsine comme son action hydrolysante (1) s'opèrent parfaitement en présence d'un liquide neutre étranger à la réaction.

Une précaution doit être prise lorsque l'on se propose d'opérer des synthèses de glucosides en milieu acétonique :

(1) EM. BOURQUELOT et M. BRIDEL. — Action de l'émulsine sur la gentiopicroïne en solution dans l'acétone et dans l'éther acétique ; *Journ. de Pharm. et Chim.*, (7), V, p. 534, 1912.

c'est de s'assurer que l'acétone employé ne contient pas d'alcool méthylique. L'acétone doit être purifié en passant par sa combinaison bisulfite. En effet, dans le commerce, l'acétone vendu comme « Acétone pur » et même parfois comme « Acétone pure du bisulfite » contient souvent d'assez fortes proportions d'alcool méthylique : le retour vers la gauche produit par l'émulsine agissant sur un mélange de ce produit avec du glucose et de l'eau peut aller jusqu'à 20'. Ce retour est dû à la formation d'une petite quantité de méthylglucoside β . Il est donc indispensable de s'assurer par une expérience-témoin de la pureté du produit (Em. BOURQUELOT).

CHAPITRE VIII.

Action synthétisante de la macération d'amande douce utilisée comme source d'émulsine.

Avant d'aborder l'étude de la préparation en grand, industrielle, oserais-je dire, de l'éthylglucoside β , il m'a paru intéressant de chercher si, sans préparer l'émulsine, une macération d'amande douce ne permettrait pas elle-même d'obtenir une synthèse rapide de l'alcool et du glucose. La préparation de l'émulsine en grande quantité est en effet assez longue, fastidieuse et coûteuse à cause de la grande quantité d'alcool fort qu'elle nécessite. On peut, bien entendu, récupérer cet alcool ; mais il y a toujours une certaine perte dans les manipulations et les distillations.

J'ai donc préparé un macéré d'amandes de la façon suivante : 200 gr. d'amandes douces ont été broyées finement au mortier et traitées par 200 cm³ d'eau distillée ; on a laissé en contact 24 heures, puis exprimé et filtré.

De ce macéré, on a fait deux parts :

L'une était destinée à être employée telle quelle ; l'autre a été traitée par quelques gouttes d'acide acétique, puis filtrée pour la débarrasser de la caséine végétale (conglutine).

D'autre part, on a préparé deux flacons contenant chacun :

Glucose pur..... 75 grammes.
Alcool éthylique à 95°... 475 grammes.

Au premier flacon on a ajouté 25 cm³ de macéré d'amande contenant la caséine végétale ; au second, 25 cm³ de macéré d'amande dont la caséine avait été précipitée.

Les deux flacons ont été placés à l'étuve à 30° et agités chaque jour.

Ils ont accusé successivement les déviations suivantes, en même temps que l'on voyait disparaître graduellement le sucre non dissous primitivement et occupant un grand volume dans les flacons :

TABLEAU XVII.

Synthèse de l'éthylglucoside β par action d'une macération d'amande douce.

ROTATION au bout de	MACÉRÉ D'AMANDE avec caséine	MACÉRÉ D'AMANDE sans caséine
25 jours.....	+ 0°52'	+ 1°20'
50 —	— 0°32'	± 0° 6'
75 —	— 1°44'	— 1°
125 —	— 3°54'	— 3°38'

Ces résultats montrent que l'action synthétisante est extrêmement lente dans ces conditions, mais néanmoins qu'elle se poursuit encore assez loin. Toutefois il est facile de se rendre compte que la lenteur de la réaction est due

seulement à la petite quantité d'émulsine mise en œuvre. A l'origine, la composition des deux mélanges se rapprochait de celle de l'essai que j'ai relaté au Chapitre V, page 44. On se rappelle que dans cet essai j'avais choisi pour effectuer la synthèse l'alcool éthylique à 90°, cet alcool permettant d'atteindre un rendement élevé en glucoside. L'obligation de choisir un alcool fort m'a mis dans la nécessité d'employer une très petite quantité seulement de macéré d'amande ; la quantité insuffisante de ferment mis en œuvre m'est apparue comme la cause unique de la lenteur de la réaction.

Pour vérifier cette hypothèse, j'ai pensé à reproduire une expérience relatée par VERDON (1), expérience qui devait permettre l'emploi d'une plus grande quantité de macéré. On sait, en effet, que pour obtenir de fortes proportions de méthylglucoside β , il faut opérer dans l'alcool méthylique à 70°. Il m'était donc facile en employant de l'alcool méthylique absolu d'ajouter une quantité suffisamment élevée de macéré d'amande pour obtenir une synthèse plus rapide. J'ai donc préparé le mélange suivant :

Glucose.....	150 gr.
Alcool méthylique pur.	254 gr.
Macéré d'amande	109 gr.

Les 109 grammes de macéré représentaient environ 200 grammes d'amandes, soit une quantité correspondant sensiblement à celle que Em. VERDON avait employée, d'après le rendement indiqué précédemment des amandes en émulsine.

Au bout d'un mois et demi, il restait encore au fond du flacon une certaine quantité de glucose ; toutefois le liquide filtré et examiné au polarimètre accusait une déviation de $+ 6^{\circ}18'$, soit un retour vers la gauche légèrement supérieur à celui que l'auteur précité avait obtenu avec la

(1) *Thèse doct. Univ. (Pharm.)*, p. 50, Paris, 1913.

quantité correspondante d'émulsine en poudre au bout d'un mois.

Donc, au point de vue de la synthèse, une macération d'amande peut être pratiquement utilisée à la place d'émulsine en poudre, pourvu que la préparation permette de mettre en œuvre une quantité de macéré telle qu'elle représente sensiblement la proportion d'émulsine sèche qu'il aurait fallu employer. Cet emploi du macéré d'amande peut donc donner d'excellents résultats dans les synthèses biochimiques ; il ne saurait être toujours employé.

On pourrait, lorsqu'il s'agit de préparer l'éthylglucoside β , employer un alcool de titre moins élevé que 90°, de façon à pouvoir mettre en œuvre une plus grande quantité de macéré ; mais nous savons que le rendement en glucoside dans les alcools moins élevés baisse rapidement ; il resterait une très grande proportion de glucose non transformée et par conséquent perdue. Il semble donc qu'il y ait avantage à employer l'émulsine sèche pour préparer ce glucoside sous un fort rendement.

CHAPITRE IX.

Etude des conditions expérimentales les mieux appropriées à la préparation de l'éthylglucoside β .

Si l'on fait une comparaison générale des résultats fournis par toutes les séries d'expériences exposées précédemment, on peut avoir des notions précises sur les conditions les meilleures pour préparer facilement par la méthode biochimique l'éthylglucoside β .

On choisira l'alcool à 90° dans lequel la synthèse donne environ 80 de produit pour 100, par rapport au glucose employé (Chapitre II); on opérera la réaction à la température de + 30° environ (Chapitre III). On emploiera une proportion d'environ 0gr.,50 d'émulsine pour 100 cm³ (Chapitre IV). On ajoutera environ 15 grammes de glucose pour 100 cm³ de liquide (Chapitre V). Le remplacement de l'émulsine par une macération d'amande (Chapitre VIII) donne lieu à une réaction trop lente dans le cas de l'éthylglucoside β ; on gagnera du temps à préparer l'émulsine en poudre.

On pourra d'ailleurs se servir de la même émulsine au

cours de plusieurs préparations successives, comme on l'expliquera plus loin.

C'est en remplissant ces conditions qu'on peut préparer facilement ce produit en quantité aussi considérable qu'on le désire. Je vais indiquer la façon suivant laquelle j'ai procédé :

Dans un flacon de 5 litres, on pèse 450 grammes de « glucose purifié du commerce » ; on ajoute trois litres d'alcool à 90° (titre volumétrique) et 15 grammes d'émulsine.

Le flacon est placé à l'étuve à + 30° et agité à 2 ou 3 reprises tous les jours.

Au bout d'un mois, le liquide accuse une forte déviation à gauche (— 3°46'). On a vu, Chapitre V, que la réaction dans de semblables conditions se ralentit considérablement au bout d'un mois ; il semble donc qu'il vaut mieux l'arrêter à ce moment, — nous reviendrons d'ailleurs plus loin sur ce point, — et procéder sans plus attendre à l'extraction de l'éthylglucoside β formé. A cet effet, on décante le liquide après un repos suffisant. Après filtration, on évapore l'alcool au bain-marie. L'extrait est repris par 5 litres d'eau, additionné de levure de bière de fermentation haute et abandonné à la fermentation. Il faut, en effet, se débarrasser des 3 grammes environ de glucose pour 100 qui se trouvent dissous dans l'alcool au moment où l'on a arrêté la réaction. On a ajouté de la levure des boulangers *très fraîche* : on sait que cette levure fait fermenter le glucose, mais n'a pas d'action sur l'éthylglucoside β .

Au bout de 16 jours, le dégagement d'acide carbonique étant terminé et la liqueur cupro-potassique ne donnant plus trace de réduction, on neutralise le liquide par un peu de carbonate de calcium, puis on filtre et on porte à l'ébullition ou au bain-marie bouillant pour détruire les ferments. On concentre ensuite le liquide à fond sous pres-

sion réduite. L'extrait obtenu pèse environ 370 grammes ; il est transparent et légèrement teinté de jaune. On le reprend *aussitôt* par 700 cm³ d'acétone pur, à l'ébullition à reflux pendant 20 minutes. Il est indispensable de reprendre l'extrait *immédiatement*, le produit étant très hygroscopique.

Après avoir laissé reposer le liquide un jour, on filtre dans un flacon bien sec et on amorce avec un cristal d'éthylglucoside β . Au bout de 48 heures, le produit commence généralement à cristalliser ; au bout d'un mois, les cristaux remplissent complètement le flacon. Une deuxième reprise de 700 cm³ donne un peu moins de produit ; une troisième reprise donne au polarimètre moins de un degré à gauche, elle ne cristallise pas.

Les cristaux formés sont très rapidement essorés, lavés par un peu d'acétone froid et placés immédiatement dans le vide sulfurique. Il importe que ces opérations soient faites avec une extrême rapidité, l'éthylglucoside β étant très hygroscopique.

La première reprise par l'acétone m'a donné 150 grammes d'un produit très blanc dont j'ai déterminé le pouvoir rotatoire :

$$\alpha_D = \frac{1,6833 \times 20}{2 \times 0,46} = -36^{\circ},5 \text{ (1).}$$

$$[p = 0 \text{ gr.}, 46 ; c = 20 ; l = 2 ; \alpha = -1^{\circ}41'].$$

Il est intéressant de faire quelques remarques justifiant le mode opératoire que je préconise ci-dessus.

J'ai indiqué précédemment pourquoi j'ai choisi l'alcool

(1) Ce chiffre est très voisin de celui qui a été indiqué par Emr BOURQUELOT ($-35^{\circ},8$) dans la conférence faite par lui devant la Société chimique de France (9 mai 1913) : *La synthèse des glucosides à l'aide des ferments*. Toutefois la quantité assez considérable de produit que j'ai obtenue permet de considérer le chiffre de $-36^{\circ},5$ comme se rapprochant davantage du pouvoir rotatoire de l'éthylglucoside β pur.

à 90° (limite élevée de la constante synthétique), je n'insisterai donc pas sur ce point. J'ai indiqué également pourquoi je considère comme préférable l'emploi de l'émulsine sèche. Il me reste à donner les raisons qui m'ont fait arrêter la réaction au bout d'un mois et choisir la proportion de 15 gr. de glucose pour 100 cm³, à mettre au début dans le mélange. Examinons d'abord pourquoi j'ai mis en œuvre 15 gr. de glucose pour 100 cm³. Si j'avais laissé la réaction se poursuivre jusqu'au bout, j'aurais eu un résultat analogue à celui de l'expérience relatée au Chapitre V. La rotation finale du liquide aurait été de — 5°28' environ. Si l'on voulait avoir la rotation propre de l'éthylglucoside formé, il faudrait, à cette rotation gauche, ajouter la rotation droite du glucose resté dissous dans la liqueur, c'est-à-dire environ 3°30', puisque j'ai trouvé que l'alcool à 90° saturé de glucose et abandonné comme témoin donne précisément une rotation d'environ 3°30' à droite, ce qui correspond sensiblement à 3 gr. de sucre dissous (1).

On peut donc admettre que la rotation due à l'éthylglucoside formé est d'environ — 9°. Elle correspond à la formation de 12 gr., 3 de produit pour 100 cm³. Pour obtenir 12 gr. d'éthylglucoside β , il faut 10 gr. de glucose pour 100 cm³, ces 10 gr. ajoutés aux 3 gr. de glucose resté dissous montrent que 13 gr. au moins de glucose mis au début sont nécessaires (2); c'est pourquoi j'avais fixé à

(1) Je m'empresse de dire d'ailleurs que ce chiffre de + 3°30' ne peut fournir qu'une indication très approximative sur la proportion de glucose dissous; en effet, la saturation et désaturation qui se produisent dans un tel milieu par suite des variations de température font varier la rotation et cette rotation est d'autant plus sensible que nous employons un sucre qui présente le phénomène de la multirotation. D'autre part lorsque la synthèse s'avance, l'éthylglucoside formé en grande quantité peut modifier dans une certaine mesure la solubilité du glucose.

(2) Il est absolument indispensable qu'une certaine proportion de glucose reste en solution à la fin de la réaction; c'est une des conditions nécessaires au cours des synthèses biochimiques.

15 gr. la quantité de glucose à mettre en présence de 100 cm³ d'alcool à 90°. Il y a de cette façon un léger excès de sucre qui ne peut nuire à la réaction et que l'on retrouve à la fin.

Connaissant la proportion de glucose restant dissous, on peut, d'autre part, calculer la proportion d'éthylglucoside qui peut se former pour atteindre à l'état d'équilibre propre à l'alcool à 90°.

A la fin de la réaction, il y a dans cet alcool (Tableau III) :

Glucose.....	0 gr., 212.
Glucoside.....	0 gr., 914.

Si donc, comme on l'a montré antérieurement, la limite reste la même dans cet alcool, quelle que soit la quantité de glucose employé, nous aurons pour l'équilibre final :

$$\frac{3 \times 0,914}{0,212} = 12 \text{ gr., } 8.$$

Soit 12 gr., 8 d'éthylglucoside formé pour 100, c'est à-dire un chiffre dont la concordance avec celui calculé d'après les données polarimétriques est tout à fait satisfaisant ; malheureusement, pour obtenir ce rendement, il faut que la réaction se poursuive pendant plus de cinq mois. C'est pourquoi on est amené, dans la préparation de l'éthylglucoside β , à arrêter la réaction plus tôt. Au bout d'un mois, on a une rotation gauche d'environ $-3^{\circ}46'$, le glucose dissous intervenant pour $+3^{\circ}30'$ environ dans la rotation finale ; c'est donc environ $-7^{\circ}16'$ qui doivent être considérés comme la rotation propre à l'éthylglucoside β formé, ce qui correspond à peu près à 10 gr. de glucoside pour 100 cm³.

On peut donc, avec les trois litres mis en train, obtenir

théoriquement 300 gr. d'éthylglucoside β en un mois.

Il paraît donc plus avantageux de ne pas attendre la fin de la réaction ; car le bénéfice, de ce fait, serait minime.

Une préparation industrielle d'éthylglucoside β pourrait se faire de la façon suivante :

Dans un certain nombre de flacons de 15 litres, on pèserait 4 kil. 5 de glucose, 50 gr. d'émulsine, et on verserait sur le mélange 10 litres d'alcool à 90°. On agiterait tous les jours le mélange placé dans une étuve à $+ 30^{\circ}$; au bout d'un mois, on décanterait l'alcool et on le remplacerait par une nouvelle quantité de 10 litres d'alcool ; au bout d'un mois encore, on remplacerait de nouveau l'alcool. On pourrait, de cette façon, obtenir facilement chaque mois, en tenant compte que le décantage ne sera évidemment jamais complet, un kilog au moins d'éthylglucoside β par flacon.

Cette méthode aurait l'avantage de ne perdre ni alcool ni glucose et de n'employer que 50 gr. d'émulsine pour les trois traitements. En effet, j'ai pu remarquer qu'un séjour de l'émulsine même pendant plusieurs mois dans l'alcool à 90° n'affaiblit que peu l'énergie du ferment (1).

C'est ce que nous montre l'essai suivant : J'ai recueilli l'émulsine qui, dans des expériences précédentes, avait séjourné pendant plus de cinq mois dans l'alcool à 90° et j'ai contrôlé son pouvoir ferment.

Dans ce but, j'ai envisagé, non pas comme on savait seulement le faire autrefois, son action hydrolytique, mais bien son action synthétisante. Je l'ai fait agir sur une solution contenant sensiblement 1 gr. de glucose pour 100 cm³ d'alcool éthylique à 70°. Concurrément, j'ai fait

(1) VERDON a montré que le contact prolongé de l'émulsine avec un alcool méthylique de titre élevé fait perdre au ferment une partie de son activité ; mais cette dernière ne s'affaiblit du reste que graduellement et avec une certaine lenteur. *Thèse Doct. Univ. (Pharm.)*, p. 24, Paris, 1913.

agir sur la même solution sucrée de l'émulsine provenant de la même fabrication, mais n'ayant pas encore servi à une synthèse. J'ai obtenu les résultats suivants (T. + 20°).

TABLEAU XVIII.

Essai de l'activité synthétisante d'une émulsine ayant séjourné pendant cinq mois dans l'alcool à 90°.

DÉVIATION des mélanges fermentaires (1 = 2) au bout de :	ÉMULSINE À ESSAYER (0 gr., 40 pour 100 cm ³)	ÉMULSINE N'AYANT PAS SERVI (0 gr., 40 pour 100 cm ³)
0 jour.....	+ 1°	+ 1°
4 —	+ 0° 42'	+ 0° 12'
8 —	+ 0° 20'	+ 0° 2'
12 —	+ 0° 8'	± 0°
16 —	± 0°	± 0°
Sucre réducteur à l'arrêt (16 à 20 jours)	0 gr., 478	0 gr., 478

L'action a été seulement un peu plus lente avec le premier échantillon d'émulsine ; l'action s'est poursuivie comme si on avait employé une quantité d'émulsine neuve notablement inférieure à 0 gr., 40 ; toutefois, la limite de la réaction a été atteinte en 16 jours, temps normal, comme on peut le voir Chapitre II.

Il est donc possible, pour ce cas déterminé (1), de se servir de la même émulsine pour plusieurs préparations. Ce point a une grande importance pratique pour un chimiste qui voudrait préparer de grandes quantités de ce produit. Nous avons vu, en effet, que les macérations d'amandes ne permettent d'obtenir qu'une synthèse très lente; on est donc amené à employer l'émulsine en poudre, préparée comme nous l'avons dit dans l'introduction de ce travail.

(1) J'ajoute « pour ce cas déterminé », car il est possible que certains des ferments qui composent l'émulsine soient détruits par ce séjour prolongé dans l'alcool; on peut seulement conclure, des expériences ci-dessus, que le ferment glucosidifiant a gardé presque toute son activité. On se rappelle l'expérience que VERNON a relatée dans son travail sur le méthylglucoside β (*Thèse Doct. Univ. (Pharm.)*, p. 24, Paris, 1913), et dans laquelle il a constaté que de l'émulsine ayant séjourné pendant cinq mois dans une solution de glucose dans l'alcool à 95 ° n'était plus capable ensuite d'hydrolyser le méthylglucoside β , mais hydrolysait encore la salicine, ce qui semble bien montrer qu'il existe, dans l'émulsine, plusieurs ferments spécifiques.

CONCLUSIONS.

Je résume ici les conclusions les plus importantes que l'on peut tirer de ce travail :

1°. — L'émulsine hydrolyse la syringine en solution dans des alcools éthyliques de différents titres ; le glucose libéré se combine à l'alcool éthylique pour donner de l'éthylglucoside β .

2°. — L'émulsine, mise en présence d'une solution contenant 1 gr. de glucose pour 100 cm³ d'alcools éthyliques de différents titres, provoque une action synthétisante entre les deux corps en présence : la proportion d'éthylglucoside β formée est constante pour un alcool de titre donné. Elle augmente avec le degré alcoolique.

3°. — La quantité de ferment mise en œuvre n'influe pas sur la limite de la réaction ; elle n'est qu'un facteur de rapidité.

4°. — Une température d'environ 30° est celle qui paraît la plus favorable à une synthèse rapide.

5°. — Quelle que soit la proportion de glucose en solution dans un alcool de titre défini, le rapport final du glucose restant et du glucoside formé est toujours le même.

6°. — Le phénol dissous, même en forte proportion (38 gr. pour 100 cm³), dans les mélanges alcooliques, n'entrave pas la marche de la réaction ; il n'entre pas non plus en combinaison.

7°. — La présence d'un liquide neutre étranger à la réaction, comme l'acétone, n'influe pas sur la marche de celle-ci ; la limite atteinte est toujours conditionnée par les quantités respectives d'eau et d'alcool contenues dans les mélanges.

8°. — L'action synthétisante d'une macération d'amandes est équivalente à celle de l'émulsine sèche si la proportion de macéré correspond à une égale quantité d'émulsine sèche.

9°. — Pour obtenir rapidement une grande quantité d'éthylglucoside β , on laissera en présence, pendant un mois environ, de l'alcool à 90° et du glucose en excès avec 0 gr., 50 d'émulsine pour 100 cm³.

Vu, bon à imprimer ;

Vu :

Le Président de Thèse,

Le Directeur de l'Ecole,

Em. BOURQUELOT.

H. GAUTIER.

Vu et permis d'imprimer :

Le Vice-Recteur de l'Académie de Paris.

L. LIARD.

TABLE DES MATIÈRES.

	Pages
CHAPITRE PREMIER. — Action de l'émulsine sur la syringine en solution dans les alcools éthyliques de différents titres	7
CHAPITRE II. — Etude de l'action synthétisante de l'émulsine dans des alcools éthyliques de différents titres.	14
CHAPITRE III. — Influence de la température sur la marche de la synthèse.	23
CHAPITRE IV. — Influence de la proportion de ferment sur la limite atteinte par la réaction synthétisante.	28
CHAPITRE V. — Variations suivant la proportion de glucose	34
CHAPITRE VI. — Synthèse de l'éthylglucoside β par l'émulsine en présence du phénol.	42
CHAPITRE VII. — Synthèse en présence d'un liquide neutre, étranger à la réaction.	46
CHAPITRE VIII. — Action synthétisante de la macération d'amande douce utilisée comme source d'émulsine.	52
CHAPITRE IX. — Etude des conditions expérimentales les mieux appropriées à la préparation de l'éthylglucoside β	56
Conclusions.	65

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE L. DECLUME, LONS-LE-SAUNIER.
